

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA**

**V HRADCI KRÁLOVÉ**

***KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD***

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2009**

**Miluše Svitáková**

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra biologických a lékařských věd

**Funkce nádorového supresoru p53  
a metody jeho analýzy**

Function of tumor suppressor p53 and methods  
for its analysis  
(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Odborný školitel: Doc. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Práce byla provedena na Ústavu patologie FN a LF MU Brno

Hradec Králové, 2009

Miluše Svitáková

## ***Poděkování***

Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc.

Doc. RNDr. Janě Šmardové, CSc.

***Za cenné rady a připomínky***

#### *Prohlášení*

*Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury a z doložených záznamů Molekulární laboratoře PAU, FN Brno, Bohunice.*

# Obsah

Obsah .....	5
Abstrakt.....	6
Summary.....	7
Seznam zkratk .....	8
1. Úvod.....	11
2. Teoretická část.....	12
2.1. Protein p53, jeho struktura a funkce .....	12
2. 1. 1. Charakteristika genu p53 a proteinu p53 .....	12
2. 1. 2. Funkce p53 .....	14
2. 1. 3. Regulace aktivity p53 .....	15
2. 1. 4. Polymorfismus p53.....	15
2. 1. 5. Mechanismy inaktivace p53 .....	16
3. Cíl práce.....	19
4. Praktická část.....	20
4. 1. Přístrojová technika .....	20
4. 2. Přehled metod – teorie .....	22
4. 2. 1. Funkční analýza, metoda FASAY .....	22
4. 2. 2. Imunobloting .....	27
4. 3. Biologický materiál.....	29
4. 4. Přehled metod - praxe .....	30
4. 4. 1. FASAY (funkční analýza p53) .....	30
4. 4. 2. Sekvenace DNA z kvasinek.....	36
4. 4. 3. Imunochemická detekce hladiny proteinu p53 .....	39
5. Výsledky.....	44
5.1. Soubor pacientů .....	44
5. 2. Analýza p53 metodou FASAY a split assay.....	44
5. 3. Sekvenace cDNA p53.....	47
5. 4. Analýza hladiny proteinu p53 pomocí imunoblotingu.....	48
5. 5. Srovnání výsledků jednotlivých analýz p53 .....	51
6. Diskuze .....	52
7. Závěr.....	55
Seznam literatury: .....	56

# **Abstrakt**

## **Miluše Svitáková: Funkce nádorového supresoru p53 a metody jeho analýzy**

Nádorový supresor p53, někdy označovaný jako „strážce genomu“, má významnou úlohu v prevenci vzniku rakoviny. V reakci na různé formy buněčného stresu aktivuje ochranné mechanismy, především zastavení buněčného cyklu a apoptózu.

Cílem mé práce byla analýza stavu p53 v souboru 30 vzorků lymfocytů separovaných z periferní krve pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Využila jsem při ní několika metod. První z nich byla detekce mutací funkční analýzou v kvasinkách (FASAY) s následným sekvenováním zachycených mutantů p53. Dalším krokem bylo hodnocení hladiny proteinu p53 v nádorové tkáni pomocí imunoblotingu.

V analyzovaném souboru jsem zachytila 7 vzorků, u nichž je možno předpokládat klonální mutaci p53.

Výsledky získané pomocí různých metod spolu korelují pouze do určité míry. Jako nejspolehlivější v detekci aberací p53 se v tomto případě projevila FASAY.

# Summary

## **Miluše Svitáková: Function of tumor suppressor p53 and methods for its analysis**

The p53 tumor suppressor, sometimes called „the guardian of the genome“, plays a major role in prevention of cancer development. As a reaction to various forms of cellular stress, it activates protective mechanisms, especially cell cycle arrest and apoptosis.

The aim of my study was to analyze the p53 status in a total of 30 samples of lymphocytes separated from peripheral blood of patients diagnosed with chronic lymphocytic leukemia. For this purpose I used several methods. First, I used functional analysis of separated alleles in yeasts (FASAY) with subsequent analysis of detected p53 mutations by DNA sequencing of the p53 cDNA isolated from positive yeast colonies. Second, I evaluated the p53 protein level in tumor cells using immunoblotting analysis.

Among 30 analyzed cases, I detected 7 cases with highly probable clonal mutation in the p53 gene. The results of p53 status obtained by different methodical approaches correlate only partially. FASAY proved to be the most reliable method in the p53 aberrations detection.

## Seznam zkratek

<b>FASAY</b>	functional analysis of separand alleles in yeast
<b>SV 40</b>	opičí virus
<b>Kb</b>	kilobase
<b>TATA</b>	Hognessův box
<b>TAF<sub>II</sub>40</b>	transkripční faktor
<b>TAF<sub>II</sub>60</b>	transkripční faktor
<b>MDM2</b>	onkogen
<b>CBP</b>	cortisol binding protein
<b>Bp</b>	base pairs
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>NLS</b>	nuclear localization signals
<b>NES</b>	nuclear export sequence
<b>P53</b>	nádorový supresor
<b>P21</b>	gen, jehož produkt navozuje blok buněčného cyklu
<b>GADD45</b>	gen, jehož produkt navozuje blok buněčného cyklu
<b>MAD2</b>	gen, navozující progresi buněčného cyklu
<b>Bax</b>	gen, navozující apoptózu a reakci na oxidativní stres
<b>APAF1</b>	gen, navozující apoptózu a reakci na oxidativní stres
<b>CD95</b>	gen, navozující apoptózu a reakci na oxidativní stres
<b>FAS</b>	gen, navozující apoptózu a reakci na oxidativní stres
<b>APO-1</b>	gen, navozující apoptózu a reakci na oxidativní stres
<b>KILLER</b>	gen, navozující apoptózu a reakci na oxidativní stres
<b>DR5</b>	gen, navozující apoptózu a reakci na oxidativní stres
<b>PIGs</b>	gen, navozující apoptózu a reakci na oxidativní stres
<b>TSP1</b>	gen, navozující inhibici abiogeneze
<b>EcK</b>	gen, tvořící buněčné signální dráhy
<b>AcK</b>	gen, tvořící buněčné signální dráhy
<b>C/EBP</b>	gen, tvořící buněčné signální dráhy
<b>Ral</b>	gen, tvořící buněčné signální dráhy
<b>TGF</b>	růstový faktor
<b>MDM4</b>	onkogen
<b>Arg 72</b>	arginin 72
<b>G1</b>	fáze buněčného cyklu
<b>EB1</b>	Epstein- Barrové virus
<b>E4</b>	adenovirus
<b>E6</b>	papilomavirus
<b>HBX</b>	protein viru hepatitidy B
<b>His</b>	histidin
<b>CpG</b>	dinukleotidy
<b>GOF</b>	gain of function
<b>P63</b>	protein
<b>P73</b>	protein



<b>ts</b>	teplotně senzitivní
<b>cs</b>	chlادově senzitivní
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>RT</b>	reverzní transkripce
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>DTT</b>	dithiotreitol
<b>dNTPs</b>	deoxynukleotidtrifosfáty
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>H<sub>2</sub>O</b>	voda
<b>DMT</b>	dimethoxytritol
<b>Pfu</b>	Pyrococcus furiosus
<b>dATP</b>	deoxadenosintrifosfát
<b>dTTP</b>	deoxthymidintrifosfát
<b>dGTP</b>	deoxguanizintrifosfát
<b>dCTP</b>	deoxcytosintrifosfát
<b>Tris</b>	hydroxymethyl aminometan hydrochlorid
<b>KCl</b>	chlorid draselný
<b>DMSO</b>	dimethylsulphoxid
<b>dsDNA</b>	double stranded DNA
<b>pSS16</b>	otevřený expresní vektor
<b>LEU2</b>	leucin
<b>yIG397</b>	kvasinkový kmen
<b>ADE2</b>	adenin
<b>PBS</b>	fosfátový pufr
<b>RTL</b>	lyzační pufr
<b>RW-1</b>	promývací pufr
<b>RPE</b>	promývací pufr
<b>DEPC</b>	Diethyl pyrokarbonát
<b>P3</b>	primer
<b>P4</b>	primer
<b>P16</b>	primer
<b>P17</b>	primer
<b>TAE</b>	2M Tris-Acetate 0,05M EDTA
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid
<b>YPDA++</b>	kompletní kultivační médium pro kvasinky
<b>nm</b>	nanometry
<b>LiAc</b>	lithium acetate
<b>SC<sup>-</sup></b>	selekční médium
<b>HCl</b>	kyselina chlorovodíková
<b>PEG</b>	polyethylenglycol
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	chlorid hořečnatý
<b>CSB</b>	complete sample buffer
<b>PMSF</b>	phenylmethylsulfonylfluorid

<b>NP40</b>	nonidet ethylfenyl
<b>BSA</b>	bovinní sérový albumin
<b>SDS</b>	sodium dodechl sulfát
<b>APS</b>	amonium per sulfát
<b>DO-1</b>	monoklonální protilátka
<b>NaCl</b>	chlorid sodný
<b>KCl</b>	chlorid amonný
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	dihydrofosforečnan draselný
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	hydrofosforečnan sodný
<b>ECL</b>	luminiscenční roztok
<b>wt</b>	wild type

# 1. Úvod

Gen p53 patří mezi nádorové supresorové geny. Tyto geny, někdy též nazývané antionkogeny, kódují proteiny, které v normálních buňkách potlačují proliferaci a udržují buňku ve stádiu klidu ( $G_0$  fáze). Inaktivace p53 je významným krokem při vývoji rakoviny. Může k ní docházet různými způsoby, nejčastější z nich jsou však mutace, které jsou přítomny téměř v polovině všech nádorů. V mnoha případech jsou v silné korelaci se špatnou prognózou dalšího vývoje nemoci, protože zhoubné nádory s mutovaným p53 jsou obvykle agresivnější a odolnější k chemoterapii. Frekvence mutací se u různých nádorů liší, v případě hematologických malignit je obvykle nižší. Nárůst našich znalostí o p53 a jeho důležitosti vybízí ke stálému intenzivnímu zkoumání jeho funkce a podrobnějším analýzám jeho stavu v různých typech nádorů. Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na vzorky od pacientů, kteří trpí chronickou lymfocytární leukémií. Mým úkolem bylo analyzovat stav p53 u tohoto onemocnění pomocí různých metod, z nichž nejvýznamnější byla funkční analýza v kvasinkách (FASAY). Ta je jako jediná ze všech metod používaných k analýze stavu p53 schopná přímo rozlišovat různé funkční typy mutací. Další analýza byla zaměřena na hodnocení hladiny proteinu p53 v nádorových buňkách, která v mnoha případech s přítomností mutace koreluje.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Protein p53, jeho struktura a funkce

#### 2. 1. 1. Charakteristika genu p53 a proteinu p53

Protein p53 byl objeven v roce 1979 jako protein, který se *in vivo* váže na velký T antigen viru SV40.<sup>1</sup> Gen kódující p53 byl nejprve považován za jeden z dalších onkogenů, až v roce 1988 bylo prokázáno, že jde ve skutečnosti o nádorový supresor. Vyskytuje se u všech významných skupin obratlovců a objeven byl dokonce i u *Loligo forbesi* (oliheň), což dokazuje, že jde o gen evolučně velice starý.<sup>2</sup>

Gen pro lidský protein p53 byl lokalizován v roce 1986<sup>3</sup> a nachází se na krátkém raménku 17. chromozomu v pozici 13.1.<sup>4</sup> Je dlouhý 20 kb a obsahuje 11 exonů a 10 intronů.<sup>5</sup>

Produkt kódovaný tímto genem je jaderný fosfoprotein o velikosti 53 kDa složený z 393 aminokyselin. Funkční molekula je tetramer (dimer dvou dimerů) a působí jako transkripční faktor<sup>6,7</sup>

Aminokyselinová sekvence p53 obsahuje pět evolučně konzervativních domén s klíčovou funkcí pro fungování proteinu a téměř 100% homologií u všech nalezených proteinů p53.<sup>8</sup> Těmto doménám odpovídají aminokyseliny 13-23, 117-142, 171-181, 234-250 a 270-286.

Ze strukturního hlediska lze protein p53 rozdělit do tří oblastí: N-koncové, centrální a C-koncové.

##### 2. 1. 1. 1. N-koncová oblast

Tato oblast obsahuje transaktivační doménu (aminokyseliny 1-50, je zde také lokalizována první z pěti evolučně konzervativních domén) a doménu bohatou prolinem (aminokyseliny 63-97)<sup>9</sup> Je zodpovědná za transkripčně transaktivační vlastnosti proteinu<sup>10</sup> a významně se také podílí na regulaci stability a funkce p53<sup>11</sup> Váže se na ni celá řada virových a buněčných proteinů, např. vazebný protein TATA<sup>12</sup> transkripční faktory TAF<sub>II</sub>40 a TAF<sub>II</sub>60<sup>13</sup> negativní regulátor p53 protein MDM2<sup>14</sup> acetyltransferázy p300 a CBP<sup>15</sup> a

mnoho dalších. <sup>16</sup> N- koncová oblast obsahuje rovněž celou řadu důležitých fosforylačních míst. <sup>17</sup>

### **2. 1. 1. 2. Centrální oblast**

Centrální část proteinu zahrnuje přibližně aminokyseliny 101-300 a obsahuje čtyři konzervativní domény II-V. <sup>18</sup> Kostru celé oblasti tvoří sendvič dvou antiparalelních  $\beta$ -listů, které jsou složené ze čtyř a pěti řetězců a jsou spojeny sérií smyček. <sup>19</sup>

Tato oblast je zodpovědná za sekvenčně specifickou vazbu na DNA. Vazebné místo pro p53 obsahuje čtyři kopie konzervativní sekvence o délce 5 bp (5'-PuPuPuC(A/T)-3'), která se opakuje ve dvou párech uspořádaných jako obrácené repetice. Afinita, s níž se p53 k jednotlivým responzivním elementům svých cílových genů váže, závisí na jejich sekvenci, obecně ale platí, že se p53 s větší afinitou váže k responzivním elementům genů zodpovědných za blok buněčného cyklu (např. p21), zatímco u genů pro apoptózu (např. bax) byla zjištěna vazba slabší. <sup>20, 21</sup>

Centrální část ovlivňuje stabilitu celého proteinu p53, denaturuje totiž již při teplotě mírně vyšší než tělesná. <sup>22</sup> Navíc je nestabilní i kineticky a při 37°C poměrně rychle přechází do rozbaleného stavu, což je následováno agregací proteinu, přestože ten může být při této teplotě termodynamicky stabilní. <sup>23</sup> Tato nestabilita je zřejmě evolučně výhodná a umožňuje přesnou regulaci hladiny proteinu a tím i jeho funkce, důsledkem je ovšem fakt, že protein p53 je silně náchylný k inaktivaci v důsledku mutace. <sup>24</sup> Bodové mutace v nádorových buňkách jsou opravdu nejčastěji lokalizované právě v této oblasti. <sup>25</sup>

### **2. 1. 1. 3. C-koncová oblast**

C-koncová oblast zahrnuje aminokyseliny 301-393. Obsahuje druhou oblast bohatou prolinem, která C- koncovou oblast spojuje s centrální částí. Za ní následuje tetramerizační doména (aminokyseliny 324-355), která reguluje oligomerizaci p53. <sup>26</sup> Tato oblast neobsahuje žádnou evolučně konzervativní doménu, ale u všech dosud známých standardních p53 byl identifikován glycin 334, který je klíčový pro vznik stabilního tetrametru. <sup>2</sup>

Zbývá část proteinu p53 (aminokyseliny 356-393) je tvořena negativní autoregulační doménou, která obsahuje převážně zásadité aminokyselinové

zbytky. <sup>26</sup> Podobně jako transaktivační doména je místem posttranslačních modifikací, které regulují funkci p53. <sup>27</sup>

C- koncová oblast je dále zodpovědná za sekvenčně nespecifickou vazbu na DNA a rozeznávání primárního poškození DNA. <sup>2</sup>

Byly v ní také identifikovány tři signální sekvence pro jadernou lokalizaci NLS („nuclear localization signals“), a to NLS1 (aminokyseliny 316-325), NLS2 (369-375) a NLS3 (379-384) <sup>28</sup> signální sekvence pro transport z jádra NES („nuclear export sequence“). <sup>29</sup>

## **2. 1. 2. Funkce p53**

Nádorový supresor p53 bývá označován jako „strážce genomu“ <sup>30</sup> protože se podílí na kontrole mnoha buněčných funkcí, např. buněčného cyklu, apoptózy, stárnutí, diferenciace a vývoje <sup>31</sup> ale také oprav DNA, replikace, transkripce a udržování stability genomu. Zajišťuje adekvátní odpověď buňky na buněčný stres a zamezuje dělení, případně poškození buněk.

Za normálních podmínek je hladina proteinu p53 v buňce nízká a protein se nachází v inaktivním stavu. <sup>32</sup> Poškození DNA, ale také další formy buněčného stresu (např. hypoxie, nedostatek nukleotidů, poškození mitotického vřeténka, tepelný šok, oxidativní stres, změna pH, kritické zkrácení telomer nebo aktivace onkogenů) indukuje stabilizaci p53 a jeho aktivaci různými posttranslačními mechanismy. Protein se hromadí v jádře, kde může transaktivovat své cílové geny <sup>33, 34</sup>

Mezi ty patří např. geny, jejichž produkty navozují blok buněčného cyklu (p21, GADD45, 14-3-3 omega aj.) nebo naopak jeho progresi (MAD2), apoptózu a reakci na oxidativní stres (bax, Apaf-1, CD95/Fas/APO1, KILLER/DR5, PIGs, aj), inhibici angiogeneze (TSP1), replikaci DNA (topoizomeráza II alfa, DNA primáza) a opravy DNA (R2), geny tvořící vnitrobuněčné signální dráhy (eck, ack, C/EBP alfa, ral), růstové faktory i jejich inhibitory (např. TGF- alfa) a další; <sup>35, 33</sup> J

Jejich počet se již odhaduje na více než 160. <sup>36</sup> V *in vitro* studiích prováděných na různých buněčných liniích bylo dokonce zaznamenáno několik tisíc genů, které byly přímo regulovány p53. <sup>37</sup>

### 2. 1. 3. Regulace aktivity p53

Regulace aktivity p53 může probíhat na úrovni transkripce, translace, konformačních změn a různých kovalentních a nekovalentních modifikací, <sup>38</sup> klíčovým mechanismem je ale zřejmě kontrola jeho stability zprostředkovaná jeho inhibitory MDM2 a MDM4 (také označovaný jako MDMX) a transkripčními koaktivátory, např. p300. <sup>36</sup> Základní úlohu při regulaci stability p53 má protein MDM2, který funguje jako ubikvitin lipáza.<sup>39</sup>

MDM2 označuje p53 ubikvitinací, a tak podporuje jeho degradaci v proteasomu. Tím za normálních podmínek udržuje v buňce nízkou hladinu proteinu p53. <sup>40</sup> Gen MDM2 je transkripčním cílem p53 <sup>39</sup> jedná se tedy o zpětnovazebnou smyčku, ve které p53 aktivuje expresi svého vlastního negativního regulátoru. Hlavním regulátorem aktivity p53 je potom protein MDM4, který se za normálního stavu váže na transaktivační doménu p53, čímž inhibuje jeho aktivitu. Poškození DNA indukuje autodestrukci MDM2 a degradaci MDM4 zprostředkovanou MDM2, dochází tak ke zvýšení stability i aktivity p53. <sup>41</sup>

N - i C-koncová oblast proteinu p53 jsou místem mnoha posttranslačních modifikací, které dále zvyšují stabilitu a aktivitu proteinu<sup>42, 27</sup>

Fosforylace N-konce p53 (Ser 15 a 20) zeslabuje interakci p53 s MDM2 a tak brání jeho degradaci <sup>42</sup> v dalších případech může indukovat nebo inhibovat pro-apoptickou funkci p53, zvyšovat jeho stabilitu, aktivitu a vazebné schopnosti, nebo může být součástí odpovědi buňky na kontakt s UV a ionizujícím zářením.

Někdy je také nutná k jeho následující acetylaci, <sup>43</sup> zvyšuje jeho afinitu k DNA <sup>44</sup> a alespoň z části se podílí na lokalizaci proteinu p53 v buňce tím, že aktivuje jeho transport do jádra. <sup>45</sup> Mezi další modifikace p53 patří sumoylace, defosforylace, glykosylace, ribosylace a redoxní regulace. <sup>33, 46</sup>

### 2. 1. 4. Polymorfismus p53

U genu p53 bylo doposud zaznamenáno 36 polymorfismů. Většina z nich je lokalizována v intronech a jejich význam je dosud nejasný. Největší pozornost je věnována polymorfismu SNP rs1042522, který se nachází ve 4.

exonu a jehož důsledkem je substituce argininu prolinem v 72. kodonu p53. Tento polymorfismus byl poprvé popsán roku 1986<sup>47</sup> a dnes je zřejmé, že má i funkční důsledky. <sup>48</sup>

Forma Arg72 je např. efektivnější při indukci apoptózy, pravděpodobně v důsledku zvýšené lokalizace v mitochondriích. Ta je přinejmenším částečně dána snadnější vazbou proteinu MDM2 na tuto variantu, což umožňuje transport p53 z jádra a pravděpodobně i jeho následnou mitochondriální lokalizaci. <sup>49</sup> Varianta Pr72 se více uplatňuje při zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a lépe aktivuje mechanismus opravy DNA. Obě varianty se dále liší svou schopností vázat komponenty transkripčních mechanismů, aktivovat transkripci a reprimovat transformaci primárních buněk. <sup>50</sup>

Tyto varianty byly také dávány do souvislosti s větší náchylností k některým typům rakoviny, např. děložního krčku, žádná korelace však zde prokázána nebyla <sup>51</sup>. Bojesen a Nordestgaard (2008)<sup>48</sup> však ve své studii zjistili, že průměrná délka života je u nositelů alely Pro 72 zhruba o 3 roky vyšší. Důvodem by mohlo být zvýšené přežívání po objevení rakoviny nebo jiných nemocí, v souladu s již zmíněným vlivem této substituce na apoptické schopnosti proteinu.

## **2. 1. 5. Mechanismy inaktivace p53**

Protein p53 může být v buňce inaktivován různými způsoby. Jedním z nich je interakce s virovými onkoproteiny, např. velkým T antigenem viru SV40, proteinem EB1 a E4 adenovirů, E6 papilomavirů nebo proteinem HBX viru hepatitidy B <sup>52, 53, 54</sup> Jiným příkladem je jaderná exkluze, která byla pozorována např. u nediferencovaných neuroblastomů a některých nádorů prsu <sup>55</sup> a kterou může mimo jiné ovlivnit i hladina již zmíněného proteinu MDM2 <sup>56, 57</sup> Amplifikace tohoto inhibitoru, která byla pozorována zhruba v 7% nádorů se standardním p53, navíc způsobuje zvýšené odbourávání p53 a vede ke ztrátě jeho funkce. <sup>58</sup>

Tento jev dále poukazuje na fakt, že signální síť p53 je úzce spojena s mnoha dalšími drahami v buňce a je pravděpodobné, že defekty v kterékoliv z těchto drah mohou, ať už kvalitativně nebo kvantitativně, ovlivnit funkci p53. <sup>37</sup>



Nejčastějším a nejvíce studovaným způsobem inaktivace p53 jsou mutace, které se vyskytují asi u poloviny lidských případů rakoviny. <sup>59</sup>

### **2. 1. 5. 1. Frekvence a lokalizace mutací p53**

První mutace p53 byla popsána v roce 1989 u karcinomu tlustého střeva <sup>60</sup> a v buněčné linii odvozené z nádoru plic. <sup>61</sup> Frekvence mutací p53 se u různých nádorů výrazně liší, nejvyšší bývá u nádorů kůže (s výjimkou melanomů), pozdních stádií nádorů močového měchýře a většiny karcinomů zažívacího traktu. Spíše vzácný výskyt mutací p53 je typický například pro karcinomy děložního čípku, prostaty, varlat a většinu hematologických malignit.

Ve většině případů se mutace nacházejí v somatických buňkách, mohou se však vyskytnout i v zárodečné linii buněk, kde představují vysoké riziko vzniku rakoviny už v raném věku. <sup>62</sup>

Analýza mutačního spektra p53 u lidských případů rakoviny ukázala spojitost mezi expozicí různým druhům karcinogenů a vývojem specifického typu rakoviny. <sup>37</sup> Toto spektrum může být dále kvalitativně i kvantitativně modifikováno různými faktory, které působí jako pozitivní a negativní filtry.

Většina mutací se nachází v centrální doméně proteinu, který je vysoce flexibilní a fragilní <sup>37</sup> mutace již byla nalezena v každém kodonu této oblasti. Biochemické a funkční studie potom dále ukázaly, že jednotlivé mutace se zde liší stupněm ztráty původní struktury a funkce.

Můžeme je proto rozdělit na dvě skupiny. <sup>2</sup> Mutace I. třídy ovlivňují aminokyseliny, které se přímo účastní vazby na DNA. Zahrnují Arg-248 a Arg-273, což jsou nejčastěji mutované aminokyselinové zbytky v p53.

Tyto tzv. kontaktní mutanty si ponechávají konformaci standardního p53 a tvoří stabilní komplexy s nemutovaným p53, které se mohou vázat na specifické části DNA. <sup>63</sup> Proto tento typ mutací nemusí vždy překážet funkci standardního p53. Mutace II. třídy (např. His-175) se objevují v oblastech důležitých pro stabilitu terciální struktury p53 a jejich důsledky jsou obvykle výraznější, protože modifikují celkovou strukturu proteinu a tím i uspořádání zbytků, které jsou v přímém kontaktu s DNA <sup>64, 65</sup>

### 2. 1. 5. 2. Funkční důsledky mutací p53

Mutace p53 zaujímají zvláštní místo mezi mutacemi ostatních nádorově supresorových genů. Ty jsou totiž obvykle inaktivovány v důsledku mutace, která buď předčasně ukončí syntézu proteinového řetězce nebo způsobí jeho úplnou eliminaci.<sup>66</sup> Pro p53 jsou naproti tomu typické bodové záměny (missense)<sup>21</sup> které tvoří asi 73,4% všech mutací.

Různé mutace p53 se mohou lišit svým funkčním a biologickým dopadem. Asi 30% bodových mutací odpovídá nukleotidové substituci v dinukleotidech CpG, v kodonech, které jsou klíčové pro vazbu DNA. Tyto mutace způsobují ztrátu vazebné aktivity.<sup>67</sup> Vysoká četnost bodových záměn však dále poukazuje na to, že mutovaný protein má zřejmě oproti standardnímu nějakou selekční výhodu.<sup>21</sup> Bylo prokázáno, že nejběžnější mutanty jsou schopny kooperace s onkogeny.<sup>68</sup> Tato pozorování vedla k hypotéze, podle které jsou bodové mutace p53 v kancerogenezi preferenčně selektované, protože protein díky nim získává specifické funkce, jež přispívají k maligní transformaci funkce (GOF- „gain-of-function“).<sup>67</sup> Základem tohoto efektu je zřejmě modulace transkriptomu nádorové buňky<sup>69</sup> významnou úlohu mají meziproteinové interakce, například s proteiny p63, p73 či topoisomérázou I.<sup>59</sup>

Transkripční aktivita p53 je mimo jiné závislá na zformování tetrameru. U některých, tzv. dominantně negativních mutací, se předpokládá, že protein vzniklý expresí mutantní alely tvoří s proteinem vzniklým expresí nepoškozené alely heterotetramery, které jsou nefunkční nebo pouze částečně funkční. Tím mutantní alela částečně vyřazuje nepoškozenou alelu z funkce<sup>70, 67</sup>

Zvláštní skupinou mutací p53 jsou mutace podmíněčné, především teplotně senzitivní (*ts*), případně chladově senzitivní (*cs*).<sup>71</sup> Výskyt těchto mutant poukazuje na skutečnost, že všechny mutace nejsou stejné. Některé jsou kompletně inaktivující, protože zcela a nezvratně rozvracejí konformaci proteinu p53 a znemožňují tak úplně jeho transkripční funkci. Jiné pouze lokálně narušují strukturu p53 v místě vazby na DNA nebo v oligomerizační doméně, ale ponechávají ji poněkud flexibilní a za určitých podmínek (např. změnou teploty) umožňují její návrat do funkční podoby, proto jsou pouze částečně inaktivující.

### 3. Cíl práce

Svou bakalářskou práci jsem prováděla na souboru 30 vzorků separovaných lymfocytů z periferní krve pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Jejím cílem bylo:

1. Analýzovat p53 pomocí FASAY (funkční analýza separovaných alel v kvasinkách), případně *split assay* (varianta FASAY).
2. Analýzovat detekované mutace sekvenováním cDNA p53.
3. Analýzovat hladinu proteinu p53 pomocí imunoblotingu.
4. Porovnat výsledky jednotlivých typů analýz p53.

## 4. Praktická část

### 4. 1. Přístrojová technika

- Centrifuga IEC Centra CI3 od firmy International Equipment Company, která slouží k izolaci lymfocytů pomocí lymphoprepu z plné krve.
- Chlazená centrifuga „BIOFUGE“ fresco od firmy Heraeus, která slouží k izolaci RNA.
- Laminární box „Microbiological safety Cabinets LABOX“ s laminárním prouděním, kde připravujeme směs k RT-PCR a k PCR.
- Termocykler PTC-100 „Programable Thermal Controller“, od firmy MJ Research, Inc. , který slouží k provedení RT a PCR. V termocykleru se nastaví program na potřebné změny teplot s využitím Peltierových článků.
- Zdroj napětí „POWER/PAC 300“ od firmy Bio-Rad k provedení vertikální elektroforézy.
- Kamera od firmy „ Vilber Lourmat“ na snímání gelu po vertikální elektroforéze.
- Spektrofotometr „Ultrospec 2000“ od firmy Pharmacia Biotech, který slouží ke stanovení koncentrace RNA, koncentrace proteinů a k určení hustoty kvasinkových kultur.
- Třepačka EB „Edmund Buhler“ od firmy Johanna Otto GmbH, ke kultivaci kvasinek.
- Termostat „Incucell“ od firmy BTM, ke kultivaci kvasinek.
- Autokláv „Varioklav H+P“ k přípravě sterilních médií a promývacích roztoků.
- Termoblok „TB1“ od firmy Biometra, který slouží k denaturaci vzorků proteinů těsně před nanesením na polyakrylamidový gel.
- Elektroforetická aparatura „ Miniprotean III“, který slouží k rozdělení proteinů v polyakrylamidovém gelu.
- Zdroj napětí „PP 4000“ od firmy Biometra.

- Blotovací zařízení „Whatman“ od firmy Biometra, sloužící k přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na pevný nosič - nitrocelulózovou membránu.
- Třepačka „WT 16“ od firmy Biometra, sloužící k promývání nitrocelulózové membrány po inkubaci se sekundární a primární protilátkou.

## 4. 2. Přehled metod – teorie

Metody analýzy stavu p53 mohou být založeny na studiu sekvence DNA (molekulární metody) nebo na hodnocení hladiny p53 v buňkách nádorové tkáně (imunochemické metody) nebo na přímé analýze některých biologických vlastností proteinu p53 (funkční analýzy). Ke stanovení stavu p53 jsem ve své práci využila metody FASAY, která patří mezi metody funkční, a metodu imunobloting, která spadá do metod imunochemických.

### 4. 2. 1. Funkční analýza, metoda FASAY

Metoda využívá reparačního mechanismu na principu homologní rekombinace („gap repair“), který se uplatňuje v kvasinkových buňkách, a toho, že lidský protein p53 funguje v kvasinkách jako transkripční faktor. FASAY je metoda jednoduchá, v porovnání s molekulárními a imunohistochemickými metodami citlivá a specifická<sup>72, 73, 74</sup> a umožňuje odlišit mutace inaktivující protein p53 od mutací tichých a od polymorfismů. Navíc se ukázalo, že tato metoda má nesmírný potenciál být dále a dále vyvíjena a obměňována, a tak sloužit k analýze stále dalších parametrů mutantů p53. Jako jediná ze všech metod používaných k analýze stavu p53 je schopná přímo rozlišit různé funkční typy mutací p53.<sup>71</sup>

Prvním krokem metody FASAY je izolace RNA z analyzované tkáně nebo leukocytů či lymfocytů periferní krve. Následně jsou metodou RT-PCR amplifikovány exony 4-10, respektive oblast mezi kodony 42 a 374 genu p53. Princip této metody spočívá v tom, že DNA je syntetizována podle předlohy RNA, která slouží jako templát. Enzym, který tento krok provádí se nazývá reverzní transkriptáza, která přepisuje RNA do jednovláknové DNA, tzv. komplementární („complementary“) DNA - cDNA. Reverzní transkriptáza vyžaduje primer a matici. V první fázi vzniká hybrid RNA/DNA. Po odstranění RNA působením DTT se syntetizuje druhé vlákno cDNA ve směru 5' - 3'. Primer je 3' - konec ssDNA vytvářející vlásenku na základě následně se párujících bází. Po reverzní transkripci následuje PCR. Je to jednoduchá enzymatická metoda, která umožňuje prakticky neomezeně amplifikovat (zmnožit) požadovaný specifický úsek DNA. Základními složkami PCR jsou templátová

(matricová) DNA, primery, DNA polymeráza, deoxynukleotidtrifosfáty (dNTPs), pufr, H<sub>2</sub>O a další složky, které zlepšují výtěžnost reakce. Templátová (matricová) DNA obsahuje úsek, který má být namnožen. Čistota a množství templátové DNA ovlivňuje účinnost reakce. Dva syntetické jednovláknové oligonukleotidy – primery - ohraničují replikovaný úsek. Primery nesmí tvořit dimery a vlásenky, to znamená, že nesmí mít vzájemně komplementární sekvence. Primery jsou vyráběny chemickou cestou. Syntéza podle požadované sekvence probíhá postupným přidáváním nukleotidů k prvnímu nukleotidu, navázanému na pevný podklad. Přidávané nukleotidy mají volný 5'-OH konec, 3'-OH konec je blokován dimetoxitrytilem DMT). DNA polymeráza je enzym katalyzující vznik fosfodiesterových vazeb. Aby nemusela být po každé reakci přidávána, používá se termostabilní DNA polymeráza. My používáme Pfu DNA polymerázu (*Pyrococcus furiosus*). Další složkou jsou deoxynukleotidtrifosfáty (dNTPs). Je to směs deoxadenosintrifosátu (dATP), deoxytimidintrifosátu (dTTP), deoxguanosintrifosátu (dGTP), deoxcytosintrifosátu (dCTP). Pufr používáme dodávaný komerčně. Hlavní složka je 10 mmol/l Tris (hydroxymetyl) aminometan hydrochlorid (Tris HCl a 50 mmol/l KCl. Další složkou je DMSO, který usnadňuje změny teploty. U PCR probíhají opakované reakční cykly, z nichž každý je tvořen třemi kroky s odlišnými požadavky na teplotu. Jsou to denaturace, navázání primerů („annealing“) a extenze. Při denaturaci dochází k zahřátí na teplotu 92 °C. Dochází k disociaci fragmentů dsDNA na jednotlivé řetězce. Při annealingu dojde ke zchlazení na teplotu, při níž dojde k navázání primerů. Jedná se o nejdůležitější krok v PCR. Na správném navázání primerů závisí úspěch celé PCR. Při extenzi dochází k vlastní syntéze nových řetězců, navazujících na 3' konce primerů. Reakce je katalyzována Pfu DNA polymerázou při teplotě 72 °C. Délka trvání závisí na délce syntetizovaného fragmentu. PCR má obvykle 20-40 opakování. V 1. cyklu vzniká řetězec nespecifické délky, v dalších vznikají řetězce specifické délky, odpovídající vzdálenosti vymezené nasednutím primerů. PCR probíhá v termocykleru, který automaticky mění pomocí tzv. Peltierových článků teplotu v kovovém bloku podle zadaného programu. Na tomto místě bych se chtěla zmínit o možné kontaminaci PCR produktu. DNA je velmi stabilní a může ulpívat na pracovních plochách, pracovních předmětech, může poletovat ve vzduchu. K falešně pozitivnímu výsledku stačí díky velké

citlivosti reakce i zcela nepatrná příměs DNA přidaná do dosud nezpracovaného vzorku. Abychom omezili rizika kontaminace, používáme v naší laboratoři laminární boxy, kde je pracovní prostor sterilizován UV světlem, jednotlivé pracovní operace provádíme v oddělených prostorách, k práci používáme ochranné rukavice, používáme špičky s filtrem, které zabraňují kontaminaci mechaniky pipet, používáme negativní i pozitivní kontrolu. Pozitivní kontrola amplifikace - DNA izolovaná z pozitivního biologického materiálu - omezuje riziko falešně negativního výsledku. Negativní kontrola amplifikace - používáme H<sub>2</sub>O namísto templátové DNA - omezuje riziko falešně pozitivní reakce. Produkt PCR detekujeme pomocí gelové elektroforézy.

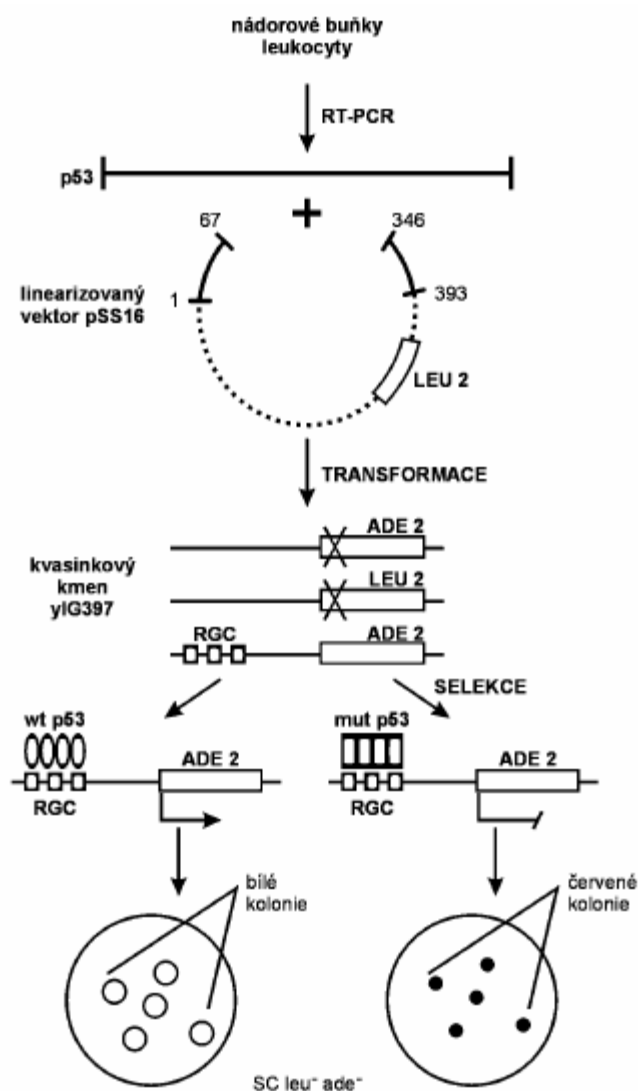
Princip gelové elektroforezy spočívá v tom, že pentozofosfátová kostra nukleových kyselin nese při neutrálním pH stejně velký záporný náboj. Fragmenty ve stejnosměrném elektrickém poli migrují ke kladné elektrodě - anodě a rychlost této migrace je závislá výhradně na jejich velikosti. Gel tvoří síťovitou strukturu s póry, které brzdí pohyb nukleových kyselin. Vzorky nanášíme do jamek smíchané s nanášecím pufrém, který obsahuje barvivo (bromfenolovou modř) pro sledování migrace. Gel připojíme ke stejnosměrnému napětí - 80V - při pokojové teplotě. Vizualizaci DNA provádíme pomocí interkalačního fluorescenčního barviva – ethidium bromidu pomocí UV transluminátoru.

Pro zjištění přítomnosti, či nepřítomnosti určitého úseku DNA v analyzovaném vzorku pozorujeme v gelu jeden specifický proužek („band“).

Produkt PCR se poté použije k transformaci kvasinek spolu s otevřeným expresním vektorem pSS16, který nese konce genu p53 a selekční marker LEU2. Kvasinkový kmen yIG397 nese auxotrofní mutace v genech pro syntézu histidinu (HIS3) a leucinu (LEU2) a obsahuje reportérský gen HIS3 s předřazeným minimálním promotorem a vazebným místem pro p53. Rekombinázový systém transformované kvasinky začlení produkt PCR do expresního vektoru a zajistí expresi lidského p53 a genu LEU2 a ADE2. Kvasinky jsou vysety na selekční médium, které neobsahuje leucin. Buňky, u kterých nedošlo k začlenění produktu PCR, nevyrostou, protože nemohou syntetizovat leucin, a tak na selekčním médiu vyrostou pouze pozitivní transformanty. Ty jsou potom v dalším kroku testovány na schopnost



syntetizovat histidin. Kvasinky exprimující mutantní p53 tvoří kolonie pouze na selekčním médiu s histidinem, protože mutantní varianta p53 nemůže reprotérský gen HIS3 aktivovat. Kvasinky exprimující funkční p53 naopak tvoří kolonie na médiu obsahujícím i postrádajícím histidin. <sup>71</sup>

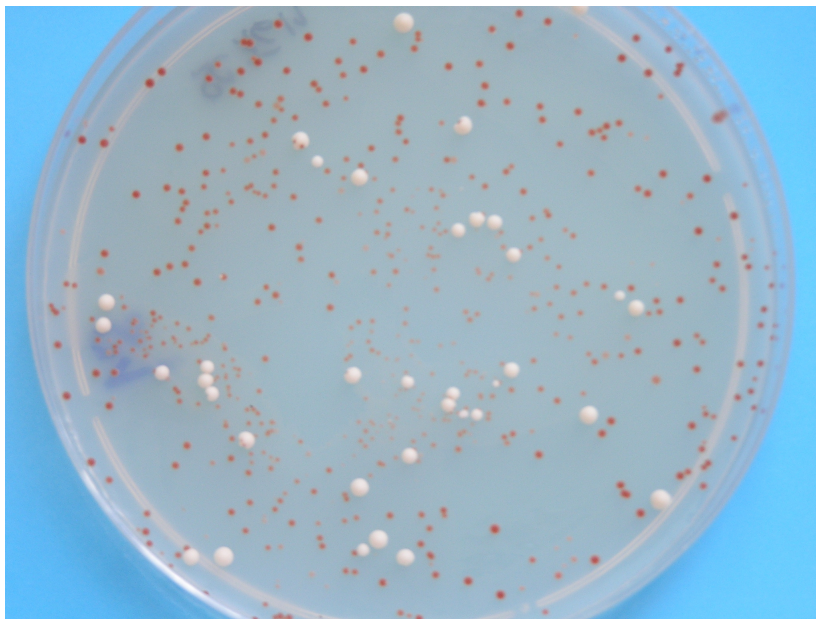


Obr.1: Schéma metody FASAY (Šmardová et al., 2004 )

V roce 1995 byla publikována další verze metody FASAY, která vtipným využitím genu ADE2 jako reportérského genu s předřazeným vazebným místem pro p53 celou metodu zrychlila tím, že spojila do jednoho kroku selekci pozitivních transformantů a analýzu aktivity proteinu p53. <sup>75</sup>

Gen ADE2 kóduje enzym fosforibosylaminoimidazolsolkarboxylasu a v buňce, která má v tomto genu mutaci, se v prostředí s nízkým obsahem

adeninu hromadí červený pigment, meziprodukt syntézy adeninu.<sup>76</sup> Proto pozitivní transformanty obsahující funkční p53 syntetizují leucin a také adenin (protože funkční p53 aktivuje reportérský gen ADE2) a tvoří na selekčním médiu bílé kolonie. Mutantní protein p53 nemůže reportérský gen aktivovat a transformované kvasinky tvoří červené kolonie, jejichž zbarvení je způsobeno akumulací červeného meziproduktu syntézy adeninu. Stav p53 je u analyzovaného vzorku stanoven vyhodnocením poměru bílých a červených kolonií, vyrostlých na selekčním médiu. Analýzou vzorků tkáně s mutovaným p53 dostaneme směs červených kolonií, které odpovídají (nádorovým i nenádorovým) buňkám s nefunkčním p53. Vzorky se standardním, tj. nemutovaným, funkčním p53 poskytnou na selekčním médiu převážně bílé kolonie a pouze malé množství červených kolonií. Tyto červené kolonie odpovídají pozadí metody a vznikají v důsledku nesprávně zařazených nukleotidů při PCR, degradace RNA a alternativním sestřihu<sup>77, 78, 79</sup>. Pozadí této metody obvykle představuje 3 až 10% červených kolonií<sup>80, 74</sup>



Obr.2.: Výsledek FASAY. Vysoký podíl červených kolonií poukazuje na přítomnost mutace p53.

Významnou výhodou této verze metody FASAY je její schopnost odlišit částečně inaktivní mutanty p53 od plně funkčních i zcela neaktivních proteinů p53. Zatímco kvasinky s plně funkčním p53 tvoří bílé kolonie, kvasinky

s nefunkčním p53 červené kolonie, částečně aktivní/neaktivní mutanty p53 dávají koloniím růžové zbarvení. Prvními částečně inaktivujícími mutacemi p53 odhalenými metodou FASAY byly teplotně senzitivní mutace 272L a 214R. <sup>75</sup>

Modifikovanou verzí metody FASAY je *split assay*, která umožňuje analyzovat odděleně 5' část a 3' část cDNA p53 <sup>79</sup> a zjistit tak, ve které části genu se mutace nachází. Výhoda a hlavní účel zavedení *split assay* spočívá v možnosti odlišení klonální mutace p53 od případné rozsáhlé degradace RNA. Při *split assay* jsou části 5' a 3' cDNA p53 amplifikovány odděleně a každý produkt PCR se použije k transformaci s jiným otevřeným vektorem. Z každého vektoru je vyštěpena jen ta část sekvence, která je homologní rekombinací v kvasinkách nahrazena produktem PCR, a zbytek tvoří divoká/standardní sekvence p53 cDNA. *Split assay* byla několikrát použita pro analýzu těch vzorků, které metodou FASAY poskytly mírně zvýšený počet červených kolonií nad úrovní pozadí. <sup>72, 79, 81</sup>

## 4. 2. 2. Immunobloting

Imunobloting patří mezi imunochemické metody. Ty jsou založeny na detekci zvýšené hladiny proteinu p53. Standardní p53 má velice krátký poločas životnosti (20 minut) <sup>82</sup> v důsledku zpětnovazebné smyčky je inhibován proteiny MDM2 a MDM4 a v buňkách není imunochemicky zachytitelný. Mutantní protein p53 má životnost prodlouženou, protože nemůže aktivovat expresi svého inhibitoru MDM2, není tedy odbouráván a hromadí se v jádře buňky. <sup>83</sup> Zvýšení hladiny p53 může tedy poukazovat na přítomnost mutace v genu p53. Detekce se provádí prostřednictvím specifické protilátky, a to na nitrocelulózové membráně po elektroforeze proteinů a jejich westernovém přenosu (imunobloting). <sup>71</sup>

Problémem těchto metod je jejich neúplná korelace mezi stabilizací proteinu p53 a přítomností mutace v genu p53. V některých případech (hypoxie, poškození DNA) může docházet i ke stabilizaci standardního p53, <sup>84</sup> falešně negativní výsledky mohou naopak vznikat v důsledku destabilizujících a sestřihových mutací, vzniku předčasných terminačních kodonů nebo mutací vedoucích ke změně struktury epitopu, na který se váže protilátka <sup>71</sup> Celkový

výsledek může být navíc dále ovlivněn použitím různých protilátek, odchylkami v použitých metodách a různými kritérii pro hodnocení positivity.

### **4. 3. Biologický materiál**

Do analýzy jsem zařadila 30 vzorků izolovaných lymfocytů z periferní krve 30 pacientů Fakultní nemocnice Brno Bohunice, diagnostikovaných v roce 2006. Mezi nimi bylo 14 mužů a 16 žen ve věku od 52 let do 85 let. U všech těchto pacientů byla diagnostikována chronická lymfocytární leukémie.

## **4. 4. Přehled metod - praxe**

### **4. 4. 1. FASAY (funkční analýza p53)**

#### **4. 4. 1. 1. Izolace lymfocytů z periferní krve pomocí lymfoprepu**

- Změřila jsem objem krve a naředila jsem ji ve sterilním PBS v poměru 1:1
- Izolace se provádí na lymfoprepu.
- Do zkumavky jsem sterilně napipetovala 3 ml lymfoprepu. Na něj jsem sterilně nanasla pipetou maximálně 5 ml krve (naředěné 1:1 ve sterilním PBS).
- Následovala centrifugace 30 min/1750 rpm/20 °C.
- Po centrifugaci jsem opatrně odebrala prstenec lymfocytů - na rozhraní lymfoprepu.
- Pak jsem lymfocyty 3x promyla ve sterilním PBS, vždy následovala centrifugace 7 min/1200 rpm/20 °C.
- Promyté lymfocyty jsem rozdělila podle množství do sterilních 1,5 ml mikrozkupek, obvykle v jednom ml PBS do každé mikrozkupek.
- Následovala centrifugace 1 min/13000rpm/20 °C.
- Odsála jsem PBS a mikrozkupek se sedimentem jsem ponořila do tekutého dusíku a následně uložila do mrazicího boxu, při teplotě -85 °C.

#### **4. 4. 1. 2. Izolace RNA**

- K izolaci jsem použila kit Rneasy total RNA purification (Qiagen).
- Sediment izolovaných lymfocytů jsem převrstvila a resuspendovala ve 350 µl pufru RLT s 3,5 µl β-merkaptoethanolu.
- Lyzát jsem přepipetovala do kolonky QIA shredder a centrifugovala 2 min/13000 rpm/20 °C (centrifuga Heraeus).
- K homogenizátu jsem přidala 1 objem (350µl) 70% ethanolu a promíchala pipetou.
- Tuto směs jsem přenesla do Rneasy kolonky a centrifugovala 1 min/13000rpm/20 °C.
- Po centrifugaci jsem odlila objem, který prostoupil kolonkou, a do kolonky napipetovala 700 µl promývacího pufru RW1.

- Následovala centrifugace 1 min/13000rpm/20 °C.
- Opět jsem odlila objem, který prostoupil kolonkou, a kolonku jsem umístila do nové 2 ml zkumavky bez víčka a přidala 500 µl promývacího pufru RPE. Následovala centrifugace 1 min/13000 rpm/20 °C.
- Odlila jsem objem a napipetovala znovu 500 µl promývacího pufru RPE. Následná centrifugace 2 min/13000 rpm/20 °C představuje vysušení membrány v kolonce.
- Pak jsem kolonku umístila do 1,5 ml mikrozkušavky a vymyla RNA 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, a to centrifugací 1 min/10000rpm/20 °C.

#### 4. 4. 1. 3 . Měření koncentrace RNA

- Z izolované RNA (30µl) jsem odebrala 2µl do 98 µl H<sub>2</sub>O (ředění 50x).
- Na spektrofotometru (Pharmacia Biotech) jsem změřila absorbanci při 260 nm. Jako kontrolu jsem použila 100µl H<sub>2</sub>O.
- Vypočítala jsem koncentraci izolované RNA podle vzorce:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 40 \times A_{260} \times \text{ředění (50x)}$$

#### 4. 4. 1. 4. Reverzní transkripce

- Složení reakční směsi:

1. a) 0,5 µl      oligo T (500 µg/ml)

b) 0,25 µg      celkové RNA, maximálně 5,5 µl

c) doplnit do 6 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Směs jsem inkubovala 10 min při 70 °C. Pak jsem ji zchladila na ledu.

2. a) 2 µl      5x First-Strand Buffer

b) 1 µl      0,1M DTT

c) 0,5 µl      10 mM dNTP (tj. 10mM adeninu, guaninu, cytosinu, tyminu)

d) 0,5 µl      enzymu SuperScript II (Invitrogen, 100U), jemně promýchat pipetováním

- Směs jsem inkubovala 50 min při 42 °C a pak 15 min při 70 °C (inaktivace)
- Získanou cDNA jsem skladovala v -20 °C nebo jsem ji rovnou použila pro amplifikaci genu p53 polymerázou *Pfu*.

#### 4. 4. 1. 5. Polymerázová řetězová reakce s využitím DNA polymerázy *Pfu*

➤ Pro PCR byly použity primery P3 (5' - CCT-TGC-CGT-CCC-AAG-CAA-TGG-ATG-AT-3') a P4 (5' ACC-CTT-TTT-GGA-CTT-CAG-GTG-GCT-GGA-GT-3')

➤ Postup:

1. připravila jsem si reakční směs:

2 µl	primer P3 (50 µg/ml)
2 µl	primer P4 (50 µg/ml)
2 µl	10x <i>Pfu</i> buffer
2 µl	DMSO
0,5 µl	10mM dNTP
9 µl	ddH <sub>2</sub> O
0,5 µl	DNA polymeráza <i>Pfu</i> (Stratagene, 1,25 U)
2 µl	cDNA

PCR pro split assay

Amplifikace 5' nebo 3' části genu *p53* s využitím DNA polymerázy *Pfu*. Složení reakční směsi bylo stejné jako v předchozím případě, lišila se pouze kombinace primerů. P17 (5'-GCC-GCC-CAT-GCA-GGA-ACT-GTT-ACA-CAT-3') byl spolu s P3 použit pro amplifikaci kodonů 67-211 genu *p53* a P16 (5'-GCG-ATG-GTC-TGG-CCC-CTC-CTC-AGC-ATC-TTA-3') v kombinaci s P4 pro kodony 210-346.

2. Inkubace probíhala v termocykleru (MJ Research, Inc.) s vyhříváním víčkem:

a) 95 °C	5 min
b) 35 cyklů:	
94 °C	30s
65 °C	60s
78 °C	80s
c) 4 °C	10 min



#### 4. 4. 1. 6. Elektroforéza DNA

➤ Produkt PCR (5µl) jsem spolu s negativní kontrolou elektroforeticky (80V) analyzovala v 1,2 % agarózovém gelu s přidavkem ethidiumbromidu (0,05 µl/ml) a po zhodnocení pod transluminátorem jsem ho klasifikovala jako + až +++ ( maximum produktu).

➤ Roztoky:

Pufr TAE:            40mM Tris pH 7,8  
                          5 mM octan sodný  
                          1 mM EDTA

6x nanášecí pufr: 0,25% bromfenolová modř  
                          0,25% xylen cyanol FF  
                          30% glycerol v H<sub>2</sub>O

#### 4. 4. 1. 7. Transformace kvasinek (7 - 8 vzorků)

➤ Zaočkovala jsem jednu kolonii kvasinkového kmene zIG397 do 5 ml kompletního média YPDA++ a nechala kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C.

➤ Zaočkovala jsem inokulum do 50 ml předehřátého média YPDA do optické hustoty 0,2 (při 600 nm) a nechala kultivovat na třepačce při 30 °C do optické hustoty 0,8 - 1,0.

➤ Centrifugace 5 min/5000rpm/20 °C. Sediment jsem resuspendovala v 50 ml H<sub>2</sub>O.

➤ Centrifugace 5 min/5000 rpm/20 °C. Sediment jsem resuspendovala v 10 ml H<sub>2</sub>O.

➤ Centrifugace 5 min/5000rpm/20 °C. Sediment jsem resuspendovala v 5 ml čerstvého roztoku LiAc/TE.

➤ Centrifugace 5 min/5000 rpm/20 °C. Sediment jsem resuspendovala v 250 µl LiAc/TE a přenesla do mikrozkupek.

➤ Centrifugace 10s/14000rpm/20 °C. Sediment jsem resuspendovala v 250 µl LiAc/TE (na 7 vzorků).

- Na ledu jsem připravila transformační směs:
  - a) 50 ng otevřeného vektoru – pSS16 pro produkt PCR s primery P3 a P4, pFW35 (primery P3+P17) nebo pFW34 (primery P4+P16)
  - b) 5-10 µl produktu PCR (podle výsledku amplifikace: 5 µl pro +++, 8 µl pro ++ a 10 µl pro +)
  - c) 5 µl 10 mg/ml denaturované sonikované salmon sperm DNA (Gibco-BRL, 5 min při 99°C, zchlazená na ledu).
  - d) 50 µl suspenze buněk
  - e) 300 µl čerstvého roztoku PEG/LiAc/TE
- Tuto směs jsem jemně promíchala a inkubovala za mírného třepání 30 min při 30°C.
- Poté inkubovala 15 min při 42°C.
- Centrifugace 10 s /14000/20°C. Sediment jsem resuspendovala ve 200 µl dd H<sub>2</sub>O.
- Takto připravené buňky jsem rozetřela na misky se selekčním médiem SC v množství 180 µl, 20 µl a 5 µl. Nechala jsem kultivovat 3 dny při 35°C a následně 2-3 dny při pokojové teplotě.
- Pak jsem vyhodnotila počet červených a bílých kolonií ( ideálně 100-500 kolonií na misku).

- Roztoky (na 1 transformaci) a média

LiAc/TE:	0,6 ml	10xLiAc
	4,8 ml	dd H <sub>2</sub> O
	0,6 ml	10xTE
10xLiAc	1M	LiAc (pH 7,5)
10xTE (Tris-EDTA)	100mM	Tris-HCl (ph 8,0)
	10mM	EDTA (pH 8,0)
PEG/LiAc/TE	300 µl	10xLiAc
	300 µl	10xTE
	2,4 ml	50%PEG

YPDA (500 ml):            5 g            kvasinkový extrakt  
                                  10 g            pepton  
                                  10 g            dextroza  
                                  100 mg        adenin

Doplnila jsem do 500 ml destilovanou vodou  
 a sterilizovala v autoklávu

➤ Roztok aminokyselin (500 ml):

0,5 g	L-alanin	L-arginin
	L-asparagin	L-asparagová kyselina
	L-cystein	L-glutamin
	L-glutamová kyselina	L-glycin
	L-histidin	L-isoleucin
	L-lysin	myo-inositol
	L-methionin	L-phenylalanin
	L-prolin	L-serin
	L-treonin	L-tryptofan
	L-tyrosin	uracil
	L-valin	
0,05 g	p-aminobenzoová kyselina	
0,025 g	3,75 µg/ml adenin	

## 4. 4. 2. Sekvenace DNA z kvasinek

### 4. 4. 2. 1. Zamražení kvasinkových kolonií

- Odebrala jsem červené kvasinkové kolonie a nechala je růst ve 2,5 ml SC média přes noc ve 30 °C.
- K 600 µl suspenze buněk jsem přidala 300 µl média SC a 300 µl glycerolu a promíchala pomocí vortexu.
- Buňky jsem uchovala v -80 °C, zbytek suspenze jsem použila na izolaci DNA.
- Roztoky a média:

SC (500 ml)	3,35 g	Yeast nitrogen base
	10 g	glukóza
	37,5 ml	roztok aminokyselin
doplnila jsem do 500 ml destilovanou vodou		
a sterilizovala v autoklávu		

### 4. 4. 2. 2. Izolace DNA

- Suspenzi buněk jsem centrifugovala 1 min/14000rpm/20 °C (centrifuga Hettich Zentrifugen).
- Sediment jsem resuspendovala v roztoku lytických enzymů (0,5 ml) a inkubovala 30 min při teplotě 30 °C.
- Pak jsem přidala 200 µl proteinázy K (4 mg/ml TE, Sigma-Aldrich), promíchala a inkubovala 30 min při teplotě 65 °C.
- Poté jsem přidala 1 objem (700 µl) směsi fenol+chloroform+izoamylalkohol (25:24:1), vortexovala a centrifugovala 2 min/14000rpm/20 °C. Vodnou (horní) fázi jsem přenesla do čisté mikrozkušavky.
- Přidala jsem 1 objem (700 µl) chloroformu, vortexovala a centrifugovala 2 min/14000 rpm/20 °C. Horní vodnou fázi jsem přenesla do čisté mikrozkušavky.
- Přidala jsem k ní 2 objemy (asi 1000 µl) 96% ethanolu, vortexovala a inkubovala minimálně 45 min v - 20 °C.
- Pak centrifugovala 30 min/14000 rpm/4 °C.

- Sediment jsem promyla 150-200  $\mu$ l 70% etanolu, centrifugovala 2 min/014000 rpm/20 °C.
- Poté jsem odsála etanol a otevřené zkumavky nechala sušit při pokojové teplotě asi 1 hod.
- Pelet jsem resuspendovala ve 40  $\mu$ l TE, pro PCR jsem ředila 1:10.
- Roztoky:
  - Roztok lytických enzymů: 0,5 ml lytické enzymy z *Trichoderma harzianum*  
(5 mg/ml dd H<sub>2</sub>O , Sigma-Aldrich)
  - 5  $\mu$ l RNáza A (10 mg/ml, Sigma-Aldrich)
  - 10  $\mu$ l 0,5M EDTA (pH 8,0)
  - 0,5  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanol

#### 4. 4. 2. 3. Polymerázová řetězová reakce s využitím DNA polymerázy *Taq*

- Připravila jsem reakční směs:
 

19,05 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O
3,5 $\mu$ l	10x <i>Taq</i> buffer
3,5 $\mu$ l	primer P3 (50 $\mu$ g/ml)
3,5 $\mu$ l	primer P4 (50 $\mu$ g/ml)
1,05 $\mu$ l	50mM MgCl <sub>2</sub>
0,7 $\mu$ l	10mM dNTPs
0,2 $\mu$ l	DNA polymeráza <i>Taq</i> (Invitrogen, 1U)
3,5 $\mu$ l	cDNA (izolovaná z kvasinkových kolonií)
- Reakční směs jsem nechala inkubovat v termocykleru (MJ Research, Inc.) s vyhříváním víčkem:
 

a) 95° C	5 min						
b) 35 cyklů	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding-right: 20px;">-94° C</td> <td>30s</td> </tr> <tr> <td style="padding-right: 20px;">-65° C</td> <td>60s</td> </tr> <tr> <td style="padding-right: 20px;">-72° C</td> <td>90s</td> </tr> </table>	-94° C	30s	-65° C	60s	-72° C	90s
-94° C	30s						
-65° C	60s						
-72° C	90s						
c) 72° C	10 min						
d) 4° C	10 min						

➤ Produkt PCR jsem analyzovala a hodnotila stejně jako u PCR s DNA polymerázou *Pfu* (viz kapitola 3.4.1.5.). Produkt jsem pak odeslala k DNA sekvenační analýze nebo uchovala v -20 °C.

#### **4. 4. 2. 4. Sekvenace produktu PCR**

➤ Sekvenace byla prováděna RNDr. Barborou Ravčukovou z genetické laboratoře Centra kardiovaskulární a transplantační chirurgie. Pro purifikaci produktu PCR byl použit MinElute PCR Purification Kit (Qiagen), pro sekvenaci v amplifikátoru ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, verze 1.1 nebo 3.1. (Applied Biosystems) a BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) pro následné přečištění. Vlastní sekvenování probíhalo v sekvenátoru ABI PRISM 3100- Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems).

### 4. 4. 3. Imunochemická detekce hladiny proteinu p53

#### 4. 4. 3. 1. Analýza hladiny p53 pomocí imunoblotingu

- Příprava lyzátů ze sedimentu lymfocytů:
- Sediment lymfocytů jsem resuspendovala v lyzačním pufru.
- Následovala inkubace 30 min v ledové lázni, centrifugace 30 min/14000rpm/4 °C.
- Pak jsem změřila koncentraci proteinů spektrofotometricky metodou Bradfordové a lyzát zamrazila do -80 °C.
- Pro elektroforézu jsem lyzát smíchala s roztokem 2xCSB v poměru 1:1.
- Roztoky:

PMSF: 87,1 mg PMSF (fenylmethylsulfonyl fluorid)  
Rozpustit v 5 ml izopropanolu

Lyzační pufr: 150mM NaCl  
1% NP-40 (nonidet=ethylfenyl PEG)  
50mM Tris-HCl ( pH 8,0)  
50mM EDTA ( pH 8,0)  
Před použitím přidat PMSF v pomru 1:50

2xCSB (Complete Sample Buffer)  
6,9 ml ddH<sub>2</sub>O  
2 ml glycerolu  
1,2 ml 1M Tris.HCl (pH 8,0)  
0,4 ml 0,2 % bromfenolová modř v 1M Tris.HCl(pH6,8)  
2 ml 20% SDS  
Před použitím přidat 100 µl β-merkaptoethanolu

- Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové:
- Do mikrozkušavky jsem nepipetovala 99 µl dd H<sub>2</sub>O , 1 µl lyzátu a 1000 µl roztoku Bradfordové (Bio-Rad).
- V kontrolním vzorku jsem nahradila lyzát ddH<sub>2</sub>O.
- Inkubace 20 min při pokojové teplotě.

- Pak jsem změřila absorbanci při vlnové délce 595 nm.
  - Z kalibrační přímky (vynesené na základě měření roztoku proteinu BSA o známé koncentraci 0,5 až 10 µg/µl) jsem odečetla koncentraci proteinů ve vzorku.
  
  - Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu:
  - Sestavila jsem elektroforetickou aparaturu (Bio-Rad).
  - Připravila jsem 10% dělicí gel, převrstvila destilovanou vodou a nechala polymerovat 30-45 minut.
  - Pak jsem nalila 4% zaostřovací gel, zasunula hřebeny a nechala polymerovat 30 minut.
  - K proteinovému lyzátu jsem přidala stejné množství roztoku 2x CSB a inkubovala 10 min při 100 °C.
  - Gely jsem umístila do elektroforetické nádoby a do ní nalila elektroforetický pufr.
  - Pak jsem nanesla vzorky.
  - Vzorky jsem nechala elektroforeticky separovat při 150mA, 300W, 80 V pro zaostřovací gel a 150mA, 300W a 130 v pro dělicí gel.
  - Po skončení elektroforézy jsem obarvila dělicí gel 30 min na třepačce v roztoku Coomassie brilliant blue, propláchla promývacím roztokem a nechala v něm gel přes noc odbarvit.
  - Gely:
- |                     |                                 |
|---------------------|---------------------------------|
| 10% dělicí gel:     | 1,46 ml H <sub>2</sub> O        |
|                     | 1,6 ml akrylamid                |
|                     | 1,88 ml 1 M Tris- HCl (pH8,0)   |
|                     | 25 µl 20% SDS                   |
|                     | 37,5 µl amonium persulphate     |
|                     | 3,75 µl TEMED                   |
| 4% zaostřovací gel: | 2.72 ml H <sub>2</sub> O        |
|                     | 0,525 ml 30% akrylamid          |
|                     | 0,470 ml 1 M Tris.HCl ( pH 8,0) |
|                     | 18,8 µl 20% SDS                 |
|                     | 15 µl APS                       |
|                     | 5 µlTEMED                       |



➤ Roztoky:

Elektroforetický pufr: 900 ml dest. H<sub>2</sub>O  
100 ml 10x přenosový pufr  
5 ml 20% SDS

Akrylamid 30%: 30g akrylamid  
0,8 g BIS (0,8%)  
100 ml red. H<sub>2</sub>O  
Přefiltrovat

Roztok Coomasie brilliant blue:

0,33 g Coomasie R 250  
150 ml metanol  
33 ml kyselina octová  
150 ml dd H<sub>2</sub>O

APS: 10% persíran amonný

Promývací roztok: 50 ml metanol  
75 ml kyselina octová  
875 ml ddH<sub>2</sub>O

➤ Imunobloting p53

- Gel s elektroforeticky separovanými proteiny, nitrocelulózovou membránou (Bio-Rad) a filtračními papíry jsem ponořila na 10 min do přenosového roztoku.
- Pak jsem je umístila na elektroforetickou aparaturu v pořadí (odspodu): filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír a vytlačila jsem vzduchové bubliny.
- Aparaturu jsem uzavřela, zapojila do zdroje elektrického napětí a blotovala 50 min při 300 W.
- Membránu jsem namočila asi na 10 s do roztoku Ponceau - pro orientační odhad úspěšnosti blotingu.
- Membránu jsem přenesla do roztoku 1xPBS a 2x propláchla.
- Pak jsem membránu přenesla do roztoku sušeného mléka a blokovala 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě.

- Oplach 2x PBS.
- Na membránu jsem nanesla primární protilátku DO-1 (DakoCytomation), naředěnou 1:10 roztokem sušeného mléka (asi 5 ml roztoku na 1 membránu) a nechala inkubovat přes noc při 4 °C.
- Membránu jsem pak promyla v roztoku:
  - PBS (10 min)
  - PBS+ Tween (0,1%) (10 min)
  - PBS (10 min)
- Pak jsem nanesla sekundární protilátku ředěnou 1:1000 roztokem sušeného mléka a inkubovala 60 min při pokojové teplotě.
- Pak opět membránu promýt tak, jak je uvedeno výše.
- Roztoky:

Ponceau S (10x koncentrovaný):

2g Ponceau S  
 30g trichloroctová kyselina  
 30g sulfosalicylová kyselina  
 Doplnit H<sub>2</sub>O do 100 ml

1xPBS

8,1g NaCl  
 0,201 g KCl  
 0,204g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 2,328g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O  
 1000 ml ddH<sub>2</sub>O (pH 7,4)

Lauryl sulfát-20% SDS:

20g lauryl sulfát  
 100 ml red. H<sub>2</sub>O

10xpřenosový pufr: 30,3g Tris-Base

144g glycin  
 1l red H<sub>2</sub>O

Přenosový pufr:

700 ml H<sub>2</sub>O  
 200 ml metanol

100 ml 10x přenosový pufr  
5 ml 20% SDS

Roztok sušeného mléka:

5g sušeného mléka (Bio-Rad)  
100 ml 1xPBS  
100 µl Tween

- Vizualizace proteinu p53 na membráně
- Membránu jsem po promytí lehce osušila filtračním papírem a položila na sklo.
- Na membránu jsem nanesla 2 ml směsi luminiscenčního roztoku ECL (GE Healthcare) A+B (1:1), rovnoměrně rozetřela a nechala působit 1 minutu.
- Pak jsem membránu důkladně osušila a překryla potravinářskou fólií.
- V temné komoře jsem na membránu přiložila film (Amersham Biosciences) a exponovala asi 5 min podle intenzity signálu.
- Film jsem vyvolala 1 min ve vývojce a 1 min v ustalovači a opláchla ve vodě.

## 5. Výsledky

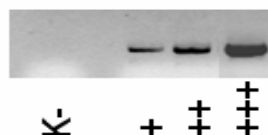
### 5.1. Soubor pacientů

Do souboru bylo zařazeno celkem 30 pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Jednalo se o 14 mužů (46,6 %) a 16 žen (53,3%). Průměrný věk pacientů byl 50 let, věkové rozmezí bylo 52 až 85 let.

### 5.2. Analýza p53 metodou FASAY a split assay

Analýzu jsem prováděla u 30 vzorků periferní krve pacientů s chronickou lymfocytární leukémií podle postupu uvedeného v předchozí kapitole.

Z připravených lymfocytů jsem izolovala celkovou RNA a změřila její koncentraci. Reverzní transkripcí jsem získala cDNA, ze které jsem následně pomocí PCR s DNA polymerázou Pfu amplifikovala část odpovídající genu p53. 5μl produktu PCR jsem elektroforeticky analyzovala v agarózovém gelu s přídavkem ethidiumbromidu a zhodnotila jeho množství. Příklady některých výsledků jsou uvedeny na obr 3 a jejich celkový souhrn je uveden v tab. 1. Počet křížků v tabulce i na všech obrázcích orientačně udává množství produktu PCR: „+++“ značí maximum amplifikátu (srovnatelné s pozitivní kontrolou); „-“, označuje jeho úplnou nepřítomnost; symbol „±“ znamená, že produkt byl sice opticky detekovatelný, ale jeho množství bylo pro většinu dalších kroků nedostatečné a analýzu bylo potřeba opakovat.



**Obr.3.:**Příklady výsledků PCR s polymerázou pfu během analýzy FASAY a srovnáním s negativní kontrolou ( K-)

Produkt PCR jsem použila k transformaci kvasinkového kmene yIG397. Po třídní kultivaci jsem spočítala poměr červených a bílých kolonií na miskách se selekčním médiem SC. Za horní mez pozadí metody jsem

považovala 10% červených kolonií. 23 vzorků, u nichž se procento červených kolonií nacházelo pod touto hranicí, jsem hodnotila jako standardní (wt). U zbývajících 7 vzorků se podíl červených kolonií pohyboval od 20,7 do 74,4%. U těchto 7 vzorků byl poměr červených kolonií vyšší než 10 %, a proto jsem uvažovala o přítomnosti klonální mutace. U čtyř z těchto sedmi vzorků jsem pokračovala v analýze, a to metodou *split assay*. *Split assay* umožňuje odlišit klonální mutace p53 od navýšeného pozadí metody vzniklého v důsledku degradace RNA ve vyšetřovaném materiálu. Navíc výsledek *split assay* poskytuje orientační představu o tom, zda se mutace nachází ve 3' nebo 5' části genu p53. Ze čtyř vzorků analyzovaných metodou *split assay*, pouze u jediného (C263) byl výsledek jasně asymetrický, silně naznačující přítomnost klonální mutace. U zbývajících tří vzorků byl výsledkem buď symetrický (C273 a C290) nebo sice asymetrický, ale s výrazným navýšením červených kolonií v obou polovinách genu p53 (viz tabulka 1)..

vzorek	koncentrace RNA [µg/ml]	PCR FASAY <sup>1</sup>	výsledek FASAY <sup>2</sup>	PCR <i>split assay</i> <sup>3</sup>	výsledek <i>split assay</i> <sup>4</sup>	stav P53
C258	266	+++	4,1%	ND	ND	wt
C259	284	+++	2,6%	ND	ND	wt
C260	364	+++	6,4%	ND	ND	wt
C261	332	+++	66,4%	+++	43,9%/72,5%	M
C262	212	+++	71,9%	ND	ND	M
C263	366	+++	53,4%	+++	52,7%/4,6%	M
C264	322	+++	1,2%	ND	ND	wt
C265	226	+++	9,7%	ND	ND	wt
C266	378	+++	7,2%	ND	ND	wt
C270	424	+++	74,4%	ND	ND	M
C272	68	+++	9,6%	ND	ND	wt
C273	210	+++	20,7%	+++	16,9%/16,2%	M
C274	312	+++	5,2%	ND	ND	wt
C277	264	+++	3,7%	ND	ND	wt
C278	204	+++	29,2%	ND	ND	M
C279	76	+++	3,1%	ND	ND	wt
C280	222	+++	4,2%	ND	ND	wt
C281	328	+++	3,6%	ND	ND	wt

C284	82	+++	4,5%	ND	ND	wt
C285	410	+++	6,5%	ND	ND	wt
C287	112	+++	6,3%	ND	ND	wt
C288	202	+++	3,2%	ND	ND	wt
C289	12	+++	9,2%	ND	ND	wt
C290	114	+++	21,0%	+++	15,4%/14,4%	M
C291	114	++	3,7%	ND	ND	wt
C293	408	++	8,3%	ND	ND	wt
C294	114	++	3,8%	ND	ND	wt
C295	36	+	2,9%	ND	ND	wt
C297	44	+++	4,9%	ND	ND	wt
C299	60	+++	6,4%	ND	ND	wt

**Tab.1.:** Souhrnný přehled výsledků získaných metodami FASAY a *split assay*. <sup>1</sup> hodnocení viz kapitola 5.1.

<sup>2</sup> výsledek uveden jako podíl červených kolonií

<sup>3</sup> hodnocení viz kapitola 5.1.; ND-neděláno

<sup>4</sup> výsledek uveden jako podíl červených kolonií při analýze části vyšetřovaného genu p53 amplifikovaného s pomocí primerů 3+17/primerů 4+16; ND-neděláno

### 5. 3. Sekvenace cDNA p53

Se vzorky C261, C262, C263, C270, C273, C278 a C290, které analýza FASAY a *split assay* detekovala jako potenciálně mutantní, jsem pokračovala v další analýze. Z misek s narostlými kvasinkovými koloniemi získanými metodou FASAY jsem pro každý analyzovaný případ odebrala 4-5 červených kolonií, z nichž jsem izolovala DNA. cDNA genu p53 jsem potom amplifikovala metodou PCR s využitím primerů P3 a P4 a DNA polymerázy *Taq*.

Malý podíl produktu PCR (5 µl) jsem analyzovala pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu. Po ukončení elektroforézy jsem opět zhodnotila množství amplifikátu a eliminovala produkty, které byly jasně důsledkem pozadí metody (kratší varianty DNA s jasnou neklonální delecí).

U cDNA p53 ze zbylých kolonií byla pro přesnou charakterizaci zachycených změn provedena sekvence DNA. Souhrnné výsledky jsou zaznamenány v tabulce 2. Sekvenováním cDNA p53 byla prokázána přítomnost klonální mutace ve všech sedmi případech. Stejná (proto klonální) mutace byla detekována vždy v nadpoloviční většině analyzovaných kvasinkových kolonií.

vzorek	podíl pozitivních kolonií	kodon	záměna aminokyselin	záměna nukleotidů
C261	5/5	234	Tyr-Cys	TAC-TGC
C262	2/2	234	Tyr-Cys	TAC-TGC
C263	5/5	176	Cys-Trp	TGC-TGG
C270	3/3	181	Arg-Cys	CGC-TGC
C273	4/5	236	Tyr-Asp	TAC-GAC
C278	3/3	214	delece 14N posun čtecího rámce	Stop v kodonu 331
C290	4/6	195	Ile-Thr	ATC-ACC

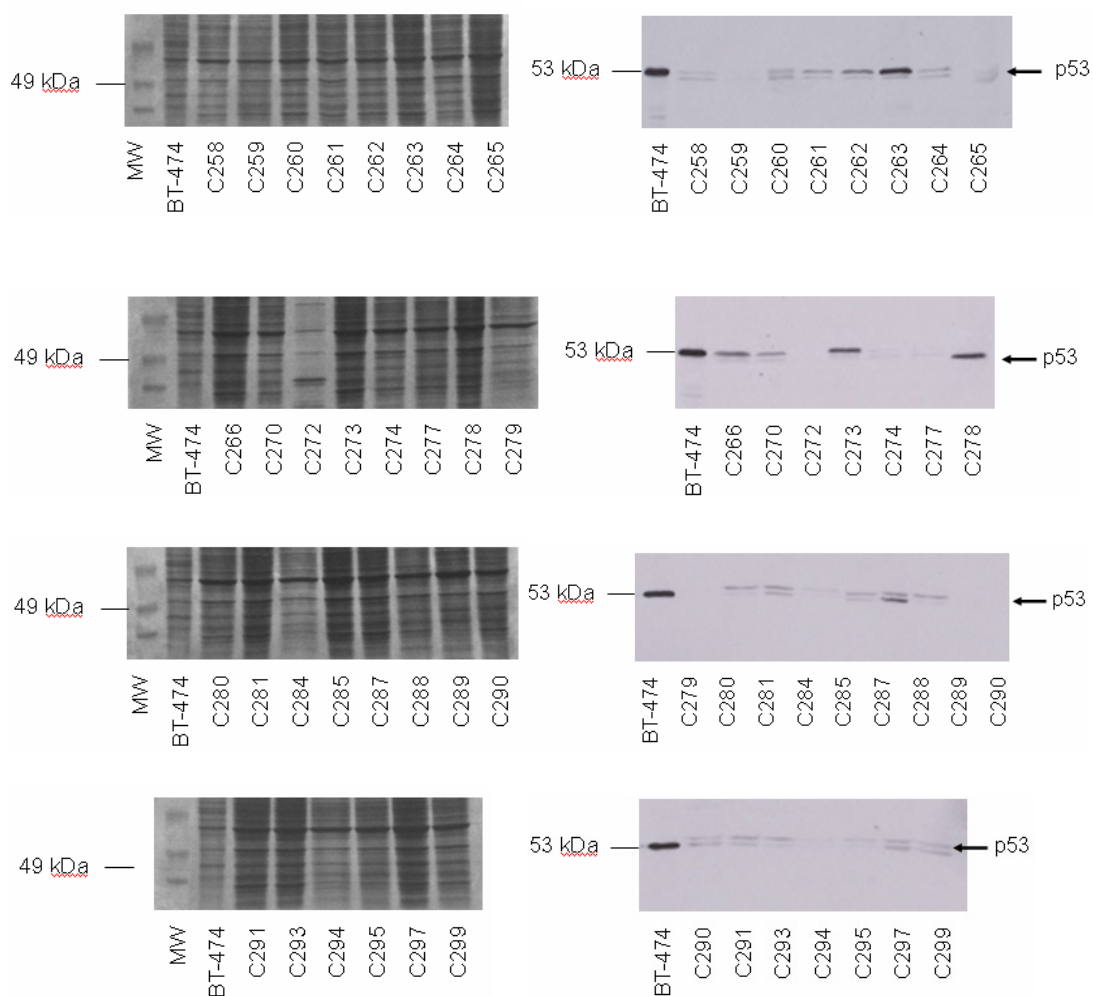
**Tab.2.:** Souhrn změn zaznamenaných sekvenováním cDNA p53 izolované z kvasinkových kolonií.

## 5. 4. Analýza hladiny proteinu p53 pomocí imunoblotingu

Ze separovaných lymfocytů jsem připravila proteinové lyzáty, u kterých jsem metodou Bradfordové stanovila koncentraci proteinů. Objem odpovídající stejnému množství celkového proteinu ve všech vzorcích jsem potom nanesla na akrylamidový gel a elektroforeticky separovala. Gel jsem následně obarvila v roztoku Coomasie brilliant blue, čímž jsem ověřila, že jsou ve všech nanášených vzorcích vyrovnané hladiny proteinů. Výjimkou byl pouze vzorek C272, u kterého byla koncentrace proteinů v lyzátu příliš nízká. Stejně množství lyzátu jsem potom u všech vzorků nanášela i na paralelní akrylamidový gel, který jsem po proběhnutí elektroforézy použila k přenosu proteinů na nitrocelulózovou membránu.

Membránu jsem následně inkubovala s protilátkami (primární protilátkou specificky rozpoznávající protein p53 a sekundární protilátkou specificky rozpoznávající primární protilátku) a srovnáním s pozitivní kontrolou BT474 (linie lidských nádorových buněk s vysokou expresí mutantního p53), klasifikovala hladinu p53 symboly „+“ až „+++“ (nadprodukce p53, hladina odpovídající pozitivní kontrole). V případě, že hladina byla nedetekovatelná, byl vzorek označen symbolem „-“. Výsledky imunoblotingu, stejně jako výsledek elektroforézy proteinů v akrylamidovém gelu po barvení v roztoku Coomasie brilliant blue, jsou uvedeny na obrázku 5.2. a jejich hodnocení srovnáním s pozitivní kontrolou je zaznamenáno v tabulce 3. U čtyř analyzovaných vzorků (C263, C273, C278 a C287) byla hladina proteinu p53 střední až vysoká, u dalších čtyř vzorků (C262, C266, C270 a C281) jsem detekovala nízkou hladinu proteinu p53. U zbylých vzorků byla hladina proteinu p53 buď zcela nedetekovatelná nebo jen velmi slabě pozitivní.





**Obr.4.:** Výsledky stanovení hladiny p53 metodou imunoblotingu. Nalevo jsou fotografie gelu po obarvení Coomassie brilliant blue, které dokazují vyrovnané hladiny proteinů v analyzovaných vzorcích. V první dráze byly naneseny standardy molekulových hmotností. Zvýrazněn je proužek odpovídající proteinu Ovalbuminu o velikosti 49 kDa. Napravo jsou výsledky imunoblotingu s pozitivní kontrolou BT474.

vzorek	hladina proteinu p53	vzorek	hladina proteinu p53
C258	+/-	C279	-
C259	-	C280	+/-
C260	+/-	C281	+
C261	+/-	C284	-
C262	+	C285	+/-
C263	+++	C287	++
C264	+/-	C288	+/-
C265	-	C289	-
C266	+	C290	+/-
C270	+	C291	+/-
C272	-	C293	+/-
C273	++	C294	-
C274	-	C295	-
C277	-	C297	+/-
C278	+++	C299	+/-

**Tab.3.:** Výsledky imunoblotingu a jejich hodnocení srovnáním s pozitivní kontrolou (BT474).

## 5. 5. Srovnání výsledků jednotlivých analýz p53

Pomocí metody Fasay jsem v souboru 30 analyzovaných vzorků zachytila 7, u kterých přichází v úvahu mutace p53. Metodou imunoblotingu byly prokázány určité rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Data z jednotlivých analýz jsou shrnuta v tabulce 4.

vzorek	pohlaví/věk	FASAY	imunobloting
C258	M/57	-	+/-
C259	M/72	-	-
C260	M/78	-	+/-
C261	F/54	66,4	+/-
C262	F/52	71,9	+
C263	M/70	53,4	+++
C264	M/52	-	+/-
C265	M/69	-	-
C266	M/53	-	+
C270	F/85	74,4	+
C272	M/85	-	-
C273	F/76	20,7	++
C274	F/72	-	-
C277	F/81	-	-
C278	M/67	29,2	+++
C279	Ž/68	-	-
C280	F/48	-	+/-
C281	F/66	-	+
C284	M/81	-	-
C285	F/69	-	+/-
C287	F/57	-	++
C288	F/78	-	+/-
C289	F/78	-	-
C290	F/63	21.0	+/-
C291	M/67	-	+/-
C293	M/69	-	+/-
C294	F/61	-	-
C295	F/71	-	-
C297	M/65	-	+/-
C299	M/54	-	+/-

**Tab.4.** Srovnání výsledků provedených analýz. Symbolem „-“, jsou označeny vzorky, které byly na základě hodnocení danou metodou klasifikovány jako standardní, symbolem „+/-“, jsou označeny vzorky, u kterých není zcela jednoznačné, zda se přiklonit k hodnocení standardní či spíše mutantní, symbolem „+“ jsou označeny vzorky, u kterých se na základě zjištěných výsledků FASAY dá předpokládat mutace.

## 6. Diskuze

Ve své bakalářské práci jsem měla za úkol analyzovat aberace nádorového supresoru p53 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. K dispozici jsem měla 30 vzorků periferní krve odebraných pacientům s tímto onemocněním. V souboru bylo 14 mužů a 16 žen. Průměrný věk pacientů byl 50 let.

Z periferní krve jsem separovala lymfocyty, tedy tu krevní buněčnou frakci, která obsahuje leukemické buňky. Separované lymfocyty byly výchozím materiálem k analýze aberací p53.

První metodou, kterou jsem použila k analýze p53, byla funkční analýza separovaných alel v kvasinkách – FASAY a její varianta *split assay*. Obě metody rutinně využíváme v naší laboratoři. Touto analýzou jsem zachytila mutaci p53 u sedmi ze 30 analyzovaných vzorků, což je 23,3%. Následné sekvenování cDNA p53 izolované z kvasinkových kolonií potvrdilo přítomnost klonální mutace ve všech těchto sedmi vzorcích. Ve srovnání s literárními údaji je podíl 23,3% pacientů s klonální mutací p53 spíše vyšší, podíl pacientů CLL s mutací p53 se obvykle pohybuje kolem 10%<sup>85</sup>. Jedním z možných vysvětlení mého výsledku by mohla být vysoká citlivost metody FASAY, která již byla opakovaně prokázána<sup>71</sup>. Avšak pravděpodobnějším vysvětlením je to, že v mém případě se jedná o malý soubor pacientů a proto je číslo zatím nepřesné.

Ze sedmi zachycených mutací p53 bylo šest mutací měnících smysl kodonu (6/7 - 85,7%) a jedna mutace (1/7 – 14,3%) byla deleční. Tento poměr mutací měnících smysl kodonu a ostatních je u nádorového supresoru p53 obvyklý. Mutace měnící smysl kodonu jsem detekovala v kodonech 176,181,195,214, 234 a 236. Mutace v kodonu 234 byla u dvou vzorků mého souboru (C261 a C262). U této mutace byl vyměněn adenin za guanin na druhém místě tripletu. Z toho vyplývá, že se jedná o tranzici. U vzorku 278, v kodonu 214 došlo k delecí 14 nukleotidů a tudíž k posunu čtecího rámce. V důsledku posunutého čtecího rámce se v kodonu 331 objevil terminační kodon a v tomto místě došlo k předčasnému ukončení translace. U kodonu 176 došlo k záměně cytozinu za guanin, jedná se tedy o transverzi. U kodonu 181 došlo k záměně cytozinu za thymin, z čehož vyplývá, že se jedná o tranzici. U

kodonu 236 došlo k záměně tyminu za guanin, jedná se tedy o transverzi a u kodonu 196 došlo k záměně tyminu za cytozin, jedná se tedy o tranzici.

Z uvedeného vyplývá, že nejčastější substituční mutace p53 jsou tranzice, přičemž asi v polovině případů jde o tranzice G-A. V této práci jsou detekované tranzice G-A 2x, v kodonu 234, u vzorků 261 a 262.

Jednou z výhod metody FASAY je její schopnost detekovat částečně aktivní/neaktivní mutace p53. Tato částečná aktivita se projeví změněným fenotypem kvasinkových kolonií<sup>75,86</sup>. V mém souboru se takový případ také vyskytl. Mutace v kodonu 234 je teplotně senzitivní a v důsledku toho mají kvasinkové kolonie exprimující tuto variantu p53 odlišný fenotyp, jsou tzv. růžové.

Zajímavé u mého souboru vzorků byly výsledky metody *split assay*. Tato metoda se používá především k rozlišení klonálních mutací p53, které ve *split assay* obvykle poskytují asymetrický výsledek, od navýšeného pozadí metody FASAY, které potom ve *split assay* poskytuje symetrický výsledek. V mém případě jsem prováděla *split assay* u čtyř vzorků, z toho u tří se symetrickým výsledkem. Ve všech třech případech ale následné sekvenování cDNA p53 potvrdilo přítomnost klonální mutace, a to v kodonech 234 (2x) a 195. Tyto kodony se skutečně nacházejí v centrální části genu p53 a vzhledem k sekvenci používaných otevřených vektorů pro obě části *split assay* se mutace v těchto kodonech promítají do obou polovin této metody. O tomto omezení *split assay* již bylo v literatuře referováno<sup>86</sup>.

Nevýhodou metod FASAY a *split assay* je možnost detekovat mutace pouze v části genu p53, která je vymezena kodony 42-374. Nelze tedy vyloučit, že v některé funkční mutace postihující koncové domény p53 zůstaly neodhaleny.

V normálních nestresovaných buňkách bývá hladina proteinu p53 udržována na nízké úrovni proteázovou degradací především prostřednictvím MDM2. Pokud je p53 nefunkční, neaktivuje MDM2 a nedegraduje se. Jestliže lze metodou FASAY určit, zda je gen p53 mutantní nebo ne, měla by také alespoň do jisté míry ukazovat na hladinu proteinu p53. Červené kolonie vlastně odpovídají nádorovým buňkám nesoucím mutaci. To znamená, že čím větší je podíl červených kolonií, tím více buněk s mutací p53 by v nádorové tkáni mělo být a tím více by se v nich měl mutantní protein hromadit.

U většiny mutantů určených metodami FASAY/*split assay* (5/7 – 71,4%) jsem skutečně zaznamenala vysokou nebo zvýšenou hladinu proteinu p53 v nádorové tkáni. Na druhou stranu, u dvou vzorků s jasně prokázanou mutací p53 (C261 a C290) jsem zvýšenou hladinu proteinu p53 nedetokovala a naopak jsem detekovala zvýšenou hladinu proteinu p53 u tří vzorků bez prokázané mutace p53 (C266, C281 a C287).

Jak tyto neshody objasnit? Nižší hladiny p53 v případě vzorku 290 je možné vysvětlit malým procentem nádorových buněk, které nesou mutaci p53. Výsledek FASAY a *split assay* byl 21% a 15,4 a 14,4%. U vzorku 261 je sice větší procento nádorových buněk nesoucích mutaci p53, ale je možné, že byla mutací vyražena pouze jedna alela. V heterozygotním stavu standardní p53 v omezené míře aktivuje MDM2 a dochází k degradaci standardního i mutantního proteinu. Dalším zajímavým jevem je, že u vzorku C278 byla zaznamenána v kodonu 214 delece s následným posunem čtecího rámce a předčasně zařazeným terminačním kodonem, což se projevilo také odpovídajícím rozdílem ve velikosti proteinu p53 v provedeném imunoblotingu.

Navýšená hladina proteinu p53 u vzorků, kde nebyla zjištěna mutace v genu p53, je pravděpodobně způsobena narušením některé regulační dráhy vedoucí k degradaci p53. Může být poškozen gen pro MDM2. Dalším důvodem může být přítomnost mutace v okrajové části genu p53, kterou metodou FASAY nelze detekovat.

## 7. Závěr

Cílem mé bakalářské práce byla analýza p53 u 30 vzorků separovaných lymfocytů z periferní krve pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Všechny 30 vzorků jsem analyzovala metodami FASAY, 4 z nich dále i metodou *split assay*. Tímto způsobem jsem zachytila 7 vzorků s klonální mutací p53. U obou analýz se téměř shodovalo procento červených kolonií. U 4 případů se procento červených kolonií pohybovalo mezi 60-80%, u 3 případů okolo 20-30%.

Ze 7 vzorků, u nichž se na základě analýzy FASAY a *split assay* dala předpokládat přítomnost klonální mutace p53, jsem izolovala cDNA z pozitivních kvasinkových kolonií. Ta byla následně analyzována sekvenováním. Výsledky sekvence potvrdily přítomnost klonální mutace u všech 7 případů, z nichž v jednom byla detekována delece s následným posunem čtecího rámce a s předčasně zařazeným terminačním kodonem v pozici 331. Ostatních šest detekovaných mutací bylo typických mutací pro p53 měnící smysl kodonu.

Hladina p53 byla hodnocena pomocí imunoblotingu u všech 30 vzorků. Zvýšená hladina p53 byla zaznamenána u 8 případů. U 5 případů se zvýšená hladina shodovala s výsledkem metody FASAY, u které byla zaznamenána mutace. U tří vzorků, kde byla hladina proteinu p53 zvýšená bez prokázané mutace v genu p53 předpokládám, že mohlo jít o narušení některé regulační dráhy, vedoucí k degradaci p53.

## Seznam literatury:

1. **Chang, C., Simmons, D.T., Martin, M.A. and Mora, P.T.** 1979. Identification and Partial Charakterization of New Antigens from Simian Virus 40-Transformed Mouse Cells. *J. Virol.* 31: 463-71.
2. **Soussi, T. and May, P.** 1996. Structural Aspects of the p53 Protein in relation to Gene Evolution: A Second Look. *J. Mol. Biol.* 260: 623-637.
3. **Miller, C., Mohandas, T., Wolf, D., Prokocimer, M., Rotter, V. and Koeffler, H.P.** 1986. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 319: 783-4.
4. **Pellegata, N.S. and Ranzani, G.N.** 1996. The signifikance of p53 mutations in human cancers. *Eur. J. Histochem.* 40: 273-82
5. **Mosner, J., Jung, D., Wilczynski, S. and Niland, J.** 1998. The MDM2 gene amplification diabase. *Nucleic Acids Res.* 26: 3453-9.
6. **Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J. and Prives, C.** 1993. The p53 protein is an unusually shaped tetrametr that binds directly to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3319-3323
7. **Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J.E., Anderson, M.E. Schwedes, J.F. and Tegtmeyer, P.** 1994. p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol. Cell Biol.* 14: 5182-91.
8. **Levine, A.J., Chang, A., Dittmer, D., Notterman, D.A., Silver, A., Thorn, K., Welsh, D. and Wu, M.** 1994. The p53 tumor suppressor gene. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 817-23
9. **Soussi, T. and Beroud, Ch.** 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluace clinical outcome. *Nature Rev.* 1: 233-240.
10. **Raycroft, L., Wu, H. and Lozano, G.** 1990. Transcriptional Activation by Wild-Type but Not Transforming Mutans of the p53 ANti –Oncogene. *Science* 31: 249-251
11. **Stavridi, E.S., Huyen, Y., Sheston, E.A. and Halazonetis, T.D.** 2005. The Three- Dimensional Structure of p53, pp. 25-52. In: *Protein Rewies*, vol.2. The p53 Tumor Suppressor Pathway and Cancer. Springer Science+Business Media, New York, 2005. Ed. Atassi., M.Z., Zambetti., G.P. Berliner, L.J., Chang, R.J.-Y., Jornvall, H., Kenyon, G.L. and Wittman-Liebold, B.
12. **Truant, R., Xiao, H., Ingles, C.J. and Greenblatt, J.** 1993. Direct Interaction Between the Transctriptional Activation Domain of Human p53 and the TATA Box-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 268: 2284-2287.
13. **Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. and Tjian, R.** 1995. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267: 100-4.
14. **Marston, N.J., Crook, T. and Vousden, K.H.** 1994. Interaction of p53 with MDM2 is independent of E6 and does not mediate wild type transformation suppressor fiction. *Oncogene* 9: 2707-2716.
15. **Grossman, S.R.** 2001. P300/CBP/p53 interaction and regulativ of p53 response. *Eur. J. Biochem.* 268: 2773-8.
16. **El-Deiry, W.S.** 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.* 8: 345-57.



17. **Soussi, T. and May, P.** 1996. Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution: A second Look. *J. Mol. Biol.* 260: 623-637.
18. **May, P. and May, E.** 1999. Twenty years of p53 research: structural and functional aspect of the p53 protein. *Oncogene* 18: 7621-36
19. **Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P.** 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Science* 265:346-355.
20. **Qian, H., Wang, T., Naumovski, L., Lopez, C.D and Brachmann, R.K.** 2002. Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites. *Oncogene* 21: 7901-11.
21. **Campomenosi P., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Frebourg, T., Gold, B., Crook, T., Inga, A., Resnick, M.A., Iggo, R. and Fronza, G.** 2001. P53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene* 20: 3573-9.
22. **Bullock, A.N., Henckel, J. and Fersht, A.R.** 2000. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definitiv of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* 19: 1245-56.
23. **Friedler, A., Veprintsev, D.B., Hansson, L.O. and Fersht, A.R.** 2003. **Kinetic instability of p53 core domain mutants:** implification for rescue by small molecules. *J. Biol. Chem.* 278: 24108-12.
24. **Joerger, A.C. and Fersht, A.R.** 2007. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutant. *Oncogene* 26: 2226-42.
25. **Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C.** 1991. P53 Mutations in Human Cancers. *Science* 253: 49-53
26. **Stavridi, E.S. Huyen, Y., Sheston, E.A. and Halazonetis, T.D.** 2005. The Tree-Dimensional Structure of p53, pp. 25-52. In: *Protein Rewies*, vol.2. The p53 Tumor Suppressor Pathway and Cancer. Springer Science+Business Media, New York, 2005. Ed. Atassi., M.Z., Zambetti., G.P., Berliner, L.J., Chang, R.J.-Y., Jornvall, H., Kenyon, G.L. and Wittman-Liebold, B.
27. **Appella, E., Anderson, C.W.** 2001 Post-translation modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* 268: 2764-72
28. **Dang, Ch.V. and Lee, W.M.** 1989. Nuclear and Nucleolar Targeting Sequences of c-erb-A, c- myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat Proteins. *J. Biol. Chem.* 264: 18019-18023
29. **Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M.** 1999. A leucine –rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulativ of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO j.* 18: 1660-1672
30. **Lane, D.P.** 1992. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-6.
31. **Sionov, R.V. and Haupt, Y.** 1998. The cellular response to p53: the decision between life and dech. *Oncogene* 18: 6145-6157.
32. **Prives, C. and Hall, P.A.** 1999. The p53 pathway. *J. Pathol* 187:112-26
33. **Bálint, É. And Vousden, K.H.** 2001. Activation and activeties of the p53 tumour suppressor protein. *Br. J. Cancer* 85: 1813-1823.
34. **Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M.** 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53

tetramerization domain: regulativ of subcellular localization and p53 activity by NES maskong. *EMBO J.* 18: 1660-72

**35. Zhao,R., Gish,K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman,W.H., Tom,E., Mack,D.H., and Levine, A.J.** 2000. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.*14: 981-93.

**36. Toledo,F. and Wahl,G.M.** 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat.Rev. Cancer* 6: 909-23.

**37. Soussi,T. and Wiman, K.G.** 2007. Shaping genetic alterations in human cancer: The p53 mutation paradigma. *Cancer Cell* 12: 303-312.

**38. Ashcroft,M. and Vousden, K.H.** 1999. Regulation of p53 stability. *Oncogene* 18: 7637-43.

**39. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. and Oren, M.** 1993. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12:461-8.

**40. Toledo,F. and Wahl,G.M.** 2007. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int.J.Biochem. Cell Biol.* 39: 1476-82.

**41. Toledo,F., Krummel, K.A., Lee,C.J., Liu,C.W., Rodewald, L.W., Tang,M. and Wahl, G.M.** 2006. A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4:p53 regulatory network. *Cancer Cell* 9: 273-85

**42. Xu Y.** 2003. Regulation of p53 responses by post- translational modifications. *Cell Death Differ.*10:400-3

**43. Kurihara, A., Nagoshi, H., Yabuki, M., Okuama, R., Obinata, M. and Ikawa,S.** 2007. Ser46 phopshorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanism of regulativ of p53-dependent apoptosis. *Genes Cells* 12: 853-61.

**44. Lakin,N.D. and Jackson,S.P.** 199. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene.* 18: 7644-55.

**45. Kawaguchi,Y., Ito, A., Appella, E. and Yao, T.P.** 2005. Charge modification at multiple C-terminal lysine residues regulates p53 oligomerization and its nukleus-cytoplasm trafficking. *J. Biol. Chem.* 281: 1394-400.

**46. Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal,V., Sandy,P., Schwarz,S.E., Scheffner, M. and Delsal, G.** 1999. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin- like protein SUMO-1. *EMBO J.* 18: 6462-71.

**47. Harris, N., Brill, E., Shohat, O., Prokocimer, M., Wolf, D., Arai, N. and Rotter, V.** 1986.Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol. Cell Biol.* 6: 4650-6.

**48. Bojesen, S.E. and Nordestgaard, B.G.** 2008. The common Germáne Arg 72 Pro polymorfism of p53 and increased longevity in humus. *Cell Cycle* 7: 158-63.

**49. Dumont, P., Leu, J. I., Della Pietra, A.C., George, D. I and Murphy, M.** 2003. The codon 72 polymorphic variant sof p53 have markety different apoptotic potential. *Nat. Genet.* 33: 357-65.

**50. Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L. and Matlashewski, G.** 1999. Two polymorphic variant sof wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell Biol.* 19: 1092-100.

**51. Koushik, A., Platt, R.W. and Franco, EL.** 2004. P53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13:11-22.

- 52. Mietz, J.A., Unger, T., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M.** 1992. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.* 11:5013-20.
- 53. Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S. and Dobbelstein, M.** 1998. Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J. Virol.* 72: 8510-6.
- 54. Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J.E., Anderson, M.E., Schwedes, J.F. and Tegtmeier, P.** 1994. P53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5182-91.
- 55. Moll, U.M., Ostermeyer, A.G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M. and Zambetti, G.** 1996. Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1126-37
- 56. Li, C., Shridhar, K. and Liu, J.** 2003. Molecular characterization of oncostatin M-induced growth arrest of MCF-7 cells expressing a temperature-sensitive mutant of p53. *Breast Cancer Res. Treat.* 80:23-37
- 57. Shmueli, A. and Oren, M.** 2004. Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers. *Mol. Cell.* 13:4-5.
- 58. Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S. and Niland, J.** 1998. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* 26: 3453-9.
- 59. Sigal, A. and Rotter, V.** 2000. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer res.* 60:6788-93.
- 60. Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., van Tuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R. and Vogelstein, B.** 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science.* 244: 217-21.
- 61. Takahashi, T., Nau, M.M., Chiba, I., Birrer, M.J., Rosenberg, R.K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A.F. and Minna, J.D.** 1989. P53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246: 491-4.
- 62. Frebourg, T., Kassel, J., Lam, K.T., Gryka, M.A., Barbier, N., Andersen, T.I., Borresen, A.L. and Friend, S.H.** 1992. Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6413-7.
- 63. May, P. and May, E.** 1999. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18: 7621-36.
- 64. Soussi, T.** 2007. P53 alterations in human cancer: more question than answers. *Oncogene* 26: 2145-56.
- 65. Levine, A.J.** 1997. P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88: 323-31.
- 66. Weisz, L., Oren, M. and Rotter, V.** 2007. Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* 26: 2202-2211.
- 67. Petitjean, A., Achatz, M. I., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P. and Olivier, M.** 2007. P53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26: 2157-65.
- 68. Hinds, P.W., Finlay, C.A., Quartin, R.S., Baker, S.J., Fearon, E.R., Vogelstein, B. and Levine, A.J.** 1990. Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat

cells: a comparison of the „hot spot“ mutant phenotypes. *Cell Growth Differ.* 1: 571-80.

**69. Deppert, W.** 2007. Mutant p53: from guardian to Allen angel? *Oncogene* 26:2142-4.

**70. de Vries, A., Flores, E.R., Miranda, B., Hsieh, H.M., van Oostrom, C.T., Sage, J. and Jacks. T.** 2002. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2948-53.

**71. Šmardová, J., Šmarda J. and Koptíková, J.** 2004. Funkční varianty nádorového supresoru p53. *Biol. Listy* 69: 191-214.

**72. Tada, M., Gigo, R.D., Waridel, F., Notami, M., Matsumoto, R., Sawamura, Y., Shinohe, Y., Ikeda, J., Abe, H.** 1997. *Mol. Carcinogenesis* 18: 171.

**73. Duddy, P. M., Hanby, A.M., Barnes, D.M., Camplejohn, R.S.** 2000. *J. Mol. Biol.* 2: 139.

**74. Meinholf-Heerlein, I., Ninci, E., Ikenberg, H., Brandstetter, T., Ihling, C., Schwenk, I., Strub, A., Schmidt, B., Bettendorf, H., Gigo, R., Bauknecht, T.** 2001. *Oncology* 60: 176

**75. Flaman, J.M., Frebourg, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Chappuis, P., Sapino, A.P., Limacher, J.M., Bron, L., Benhattar, J., Tada, M., Van Metre, E. G., Estreicher, A., Gigo, R.D.** 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3963.

**76. Stotz, A., Linder, P.** 1990. *Gene* 95: 91.

**77. Flaman, J.M., Waridel, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Ishioka, C., Friend, S.H., Gigo, R.** 1994. *Nucl. Acid. Res.* 22 : 3259.

**78. Flaman, J.M., Waridel, T., Estreicher, A., Vannier, A., Limacher, J.M., Gilbert, D., Gigo, R., Frebourg, T.** 1996. *Oncogene* 12: 813.

**79. Waridel, F., Estreicher, A., Bron, L., Flaman, J.M., Fontollet, C., Monnier, P., Frebourg, T., Gigo, R.** 1997. *Oncogene* 14: 163.

**80. Kashiwazaki, H., Tonoki, H., Tada, M., Chiba, I., Shindoh, M., Totsuka, Y., Gigo, R., Moriuchi, T.** 1997. *Oncogene* 15: 2667.

**81. Chappuis, P.O., Estreicher, A., Dieterich, B., Bonnefoi, H., Ožger, M., Sapino, A.P., Gigo, R.** 1999. *Int. J. Oncol.* 84: 587.

**82. Lal, P., Pal, L., Kumar, S., Dimri, K., Tiwari, A., Rastogi, N., Singh, S. and Datta, N.R.** 2007. Implications of p53 over- expression in the outcome with radiation in head and neck cancer. *J. Cancer. Res. Ther.* 3? 17-22.

**83. Blahosklonný, M.V.** 1997. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* 15: 1889-93.

**84. Georgescu, C.V., Saftoiu, A., Georgescu, C.C., Ciurea, R. and Ciurea T.** 2007. Correlations of proliferation markers, p53 expression and histological findings in colorectal carcinoma. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 16: 133-9.

**85. Trbušek, M., Malčíková, J., Šmardová, J., Kuhrová, V., Mentzlová, D., Francová, H., Bukovská, S., Svitáková, M., Kuglík, P., Linková, V., Doubek, M., Brychtová, Y., Zcal, J., Kubíčková, J., Pospíšilová, S., Dvořáková, D., Vorlíček, J. and Mayer J.** 2006. Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia* 20: 1159-1161.

**86. Pavlová, Š., Mayer, J., Koukalová, H., Šmardová, J.** 2003. High frequency of temperature-sensitive mutations of p53 tumor suppressor in

acute myeloid leukemia revealed by functional assay in yeast. Internacionál  
journal of oncology 23, 121-131.

▪